

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

División de ciencias biológicas y de la salud posgrado en biotecnología

**REUSO DEL ARROZ PARA LA PRODUCCIÓN DE
CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS**

Que para obtener el grado de:

Maestro en biotecnología

Presenta

I.B.Q. Víctor Uribe Jalpa

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESOR

DR. OSCAR ARCE CERVANTES

ASESOR

JUNIO DE 2018

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de CONACYT, en el nivel de Competencia Internacional, con la referencia 001465.

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

“Reuso del arroz para la producción de conidios de hongos entomopatógenos”

Que presentó:

Víctor Uribe Jalpa

Comité Tutorial:

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

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Asesor: Dr. Oscar Arce Cervantes. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres _____

Secretario: Dr. Oscar Arce Cervantes _____

Vocal: Dr. Paul Misael Garza López _____

Vocal: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández _____

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

“Reuso del arroz para la producción de conidios de hongos entomopatógenos”

Que presentó:

Víctor Uribe Jalpa

Comité Tutorial:

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

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

Asesor: Dr. Oscar Arce Cervantes. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres _____

Secretario: Dr. Oscar Arce Cervantes _____

Vocal: Dr. Paul Misael Garza López _____

Vocal: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández _____

AL CONACYT POR LA BECA OTORGADA (No. DE BECARIO 570285)

Agradecimientos.

Al Dr. Octavio Loera Corral por sus comentarios y aportes a esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio Briseida y Facundo por sus consejos y por estar conmigo.

A mis amigos de la Licenciatura y maestría por su apoyo incondicional y por su grata compañía (Eduardo, José Luis, Gerardo, Paulina y Luisa)

Dedicatorias

A mi familia principalmente a mi mamá Martha Jalpa Flores, a mi papá Víctor Uribe Pola y a mis hermanos Daniela y David, gracias por todo.

Y en especial a mi esposa Alejandra Domínguez Guzmán, por su ayuda y apoyo incondicional.

Índice

Índice de Tablas.....	I
Índice de figuras	I
Glosario de término, abreviaturas y símbolos	II
1. Marco Teórico	1
1.1 Producción de alimentos y problemas de la salud.....	1
1.2 Control biológico	1
1.3 Plaga.....	2
1.4 Agentes de control biológico	2
1.5 Patógenos	3
1.6 Hongos entomopatógenos	4
1.7 <i>Beauveria bassiana</i>	6
1.8 <i>Metarhizium</i> spp.....	6
1.9 Sistemas de producción de hongos entomopatógenos a gran escala.....	6
2. Antecedentes	9
3. Justificación.....	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos.....	10
5.1 General	10
5.2 Particulares.....	10
6. Materiales Y Métodos.....	11
6.1 Material biológico	11
6.2 Reactivación	11
6.3 Medios de cultivo.....	11
6.4 Conservación de microorganismos	12
6.4.1 A corto plazo	12
6.4.2 Largo plazo	13
6.5 Sustrato para el cultivo en medio sólido	14
6.5.1 Descripción	14
6.5.2 Tratamientos.....	15

6.6 Propagación.....	16
6.7 Cultivo bifásico	17
7. Análisis comparativo del cultivo bifásico y sólo esporas.....	17
7.1 Cultivo bifásico.....	17
7.2 Inoculación directa sólo con esporas.....	17
7.3 Cinética de producción de conidios	18
7.3.1 Extracción de conidios	18
7.3.2 Viabilidad.....	18
7.4 Reuso del arroz	19
7.4.1 Primer reuso	19
7.4.2 Segundo reuso	20
7.5 Cuantificación de la relación carbono/nitrógeno	20
7.6 Porosidad	21
7.7 Infectividad	22
7.8 Análisis estadístico	23
8. Resultados y discusión de resultados.	24
8.1 Reactivación de las cepas	24
8.2 Conservación a corto plazo.....	24
8.3 Conservación a largo plazo.....	26
8.4 Cinética de producción de conidios	26
8.5 Efecto del cultivo bifásico	29
8.5.1 Análisis del efecto del cultivo bifásico en la producción de conidios.....	29
8.6 Reuso del arroz	33
8.6.1 <i>Beauveria bassiana</i> TAC 1.....	34
8.6.2 <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1	35
8.6.3 <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1	37
8.7 Relación C/N	41
8.8 Porosidad	42
8.9 Pruebas de calidad.....	43
8.10 Infectividad.....	47
9. Resumen de resultados.....	50

10.	Conclusión	51
11.	Perspectivas.....	52
12.	Bibliografía	53

Índice de Tablas

Tabla 1. Formulación del medio SDA.	12
Tabla 2. Composición del medio MS.....	12
Tabla 3 Formulación del medio SDA con desoxicolato de sodio.	12
Tabla 4 Conservación a corto plazo en viales con agua desionizada para <i>Beauveria bassiana</i> Tac 1, <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 y <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1.	25
Tabla 5 Unidades formadoras de colonias de <i>Beauveria bassiana</i> Tac 1, <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 y <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 después de dos meses de liofilizar.	26
Tabla 6 Parámetros de infectividad de los conidios de <i>Beauveria bassiana</i> Tac 1, <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 y <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 con <i>G. mellonella</i> con huésped.	49

Índice de figuras

Figura 1.-Ciclo infectivo de hongos entomopatógenos en cutícula de insecto: A: Primero el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, entonces los conidios germinan y generan el tubo germinativo perforando la cutícula, se da un crecimiento vegetativo en el interior del hospedero y en su exterior son producidas las esporas después de la muerte del hospedero. La infección es exitosa solo si el hongo puede superar la respuesta inmune del insecto (Thomas y Read, 2007).	5
Figura 2. Vial de vidrio con trozos de agar colonizado.....	13
Figura 3. Ampolletas (Wheaton) con capacidad para 10 mL.	14
Figura 4. Frasco de 125 mL tipo Gerber con 10 gramos de arroz.....	15
Figura 5. Imágenes del sustrato: a) Grano de arroz antes de la cinética de producción de conidios, b) Grano de arroz colonizado por <i>M. robertsii</i> , c) Grano de arroz después del lavado y secado.	16
Figura 6. Cepas de hongos entomopatógenos propagados en medio SDA, a) <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1, b) <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 y c) <i>Metarhizium Robertsii</i> Cuj 2.1.....	16
Figura 7. Equipo PERKIN ELMER Serie II CHNS/O Analyser 2400.	21
Figura 8. Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> micosadas por cada hongo, a) <i>Beauveria bassiana</i> Tac 1, b) <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 y c) <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1.	24
Figura 9. Cinética de producción de conidios y análisis de varianza para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1, <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 y para <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1, en el análisis de varianza con ($\alpha=0.05$) se encontraron dos grupos para <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1 (a y b) para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 fueron (A y B) y para <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 fueron (Z, X y Y).	28
Figura 10. Segunda Cinética de producción de conidios y análisis de varianza para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1, <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 y para <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1, en el análisis de varianza con ($\alpha=0.05$) se encontró un grupo para <i>Beauveria bassiana</i> Tac-1 (a) para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 fueron (A y B) y para <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 fueron (Z y X).....	29
Figura 11. Cinética de producción comparativa de <i>B. bassiana</i> Tac 1 entre el cultivo bifásico y sólo esporas.....	31
Figura 12. Cinética de producción comparativa de <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 inoculados usando el cultivo bifásico y sólo esporas.	32

Figura 13. Cinética de producción comparativa de <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 entre el cultivo bifásico y sólo esporas.....	33
Figura 14. Producción de conidios a los 7 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado (Ar) para <i>B. bassiana</i> Tac 1.	34
Figura 15. Producción de conidios a los 7 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar ₂) para <i>B. bassiana</i> Tac 1.	35
Figura 16. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar) para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1.	36
Figura 17. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar ₂) para <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1.	37
Figura 18. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar) para <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1.....	38
Figura 19. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar ₂) para <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1.....	39
Figura 20. Análisis comparativo de relaciones C/N para arroz fresco (Af) y arroz reutilizado (Ar) (100% reusado para cada cepa).	41
Figura 21. Estimación de la porosidad para los sustratos reutilizados de cada una de las cepas.	43
Figura 22. Prueba de viabilidad a los 7 días de cultivo sólido de <i>Beauveria bassiana</i> Tac 1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.	44
Figura 23. Prueba de viabilidad a los 10 días de cultivo sólido de <i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.	45
Figura 24. Prueba de viabilidad a los 10 días de cultivo sólido de <i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.	46

Glosario de término, abreviaturas y símbolos

Af	Arroz fresco
Af:Ar	Proporción de arroz fresco y arroz reutilizado
Af:Ar ₂	Proporción de arroz fresco y arroz reutilizado por segunda vez
Ar	Arroz reutilizado
Ar ₂	Arroz reutilizado dos veces
C/N	relación carbono y nitrógeno
CMS	Cultivo en medio solido
conidios/gssi	conidios por gramo de sustrato seco inicial
Conidios/mL	Conidios Por mililitro
g/L	Gramos por litro
H	Hora
K	Tasa especifica de muerte (d-1)

LT ₅₀	el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad
mg	Miligramos
MH	Materia humedad.
micrones de Hg	Presión
mL	Mililitros
mm ²	Milímetros cuadrados
MS	Maltosa Sabouraud
MS	Materia seca
n	Número de colonias
p	Probabilidad de un suceso
S	porcentaje de sobrevivencia
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
t ₀	el tiempo en el que aparece la primera larva muerta
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Porcentaje de viabilidad de los conidios
V _s	volumen ocupado en mililitros
V _t	volumen total en mililitros
X	Masa de agua para el ajuste
Y	porcentaje de sobrevivencia
α	Intervalo de confianza
ε	Porosidad
μL	Microlitros
%	Porcentaje
%H	Porcentaje de humedad deseado para el ajuste
°C	Grados centígrados

Resumen.

El incremento descontrolado de la población mundial, trae consigo la intensificación de la agricultura por la demanda de alimentos que se genera y con la intensificación de la agricultura por medio de la mecanización, los cambios en el calendario de las operaciones agrícolas, la conversión de los pastizales en tierras de cultivo y el aumento en insumos agroquímicos (insecticidas), esto último conlleva efectos nocivos en la salud de los humanos, además en los insectos se ha observado resistencia a este tipo de productos por lo cual se requiere plaguicidas más agresivos. Los plaguicidas se han convertido en un problema ya que se transfieren al agua y al aire, lo cual genera tasas elevadas de enfermedades crónicas, tales como: Diferentes tipos de cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, etc. Por lo que surge la necesidad de combatir las plagas de insectos con métodos menos peligrosos, con lo cual surge el control biológico.

El control biológico se centra en usar los enemigos naturales de las plagas, los enemigos naturales se llevan a niveles de concentraciones tal que puedan disminuir los insectos plaga sin que la plaga sea erradicada por completo llevándola a una densidad poblacional controlada. Algunos géneros de hongos entomopatógenos más utilizados son: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y *Lecanicillium*. Para el control de las plagas se usan las esporas o los conidios por ser la unidad más infecciosa para lo cual el conidio debe adherirse a la cutícula del insecto, germinar y generar un tubo germinal que abre brecha al integumento del hospedero. Al estar en la cavidad del insecto el hongo debe reproducirse rápidamente para poder matar al insecto por el efecto de la invasión de los cuerpos hifales y los protoplastos.

Para la producción de esporas en esta investigación se pesaron 10 gramos de arroz precocido de la marca Verde Valle en frascos de tipo Gerber de 125 mL y se tapó con papel aluminio, el arroz en los frascos se esterilizó en seco a 120 °C durante 15 minutos, posterior al enfriamiento se calculó la cantidad de agua necesaria para obtener un contenido de humedad del 28%, también se realizó una extracción de conidios de Tween 80 al 0.05% el cual se estandarizó en una suspensión de 1×10^7 conidios/mL y se inoculó 1 mL de esta suspensión en los 10 gramos de arroz que previamente se esterilizó, se agregó el agua suficiente para tener una humedad del 28% y se incubó a 28°C.

Dentro de las contribuciones de este trabajo se evaluó el efecto de usar esporas en cultivo bifásico (esporas germinadas) en contraste con usar únicamente esporas sin germinar para las cepas *Beauveria bassiana* Tac 1, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1, también se determinó el día máximo de producción de esporas en un periodo de 12 horas. Para la fase líquida del cultivo bifásico se germinaron las esporas de los hongos anteriormente mencionados se usó el medio Maltosa Sabouraud el cual se puso en contacto con las esporas para que germinen en un periodo de 10 horas, posteriormente se estandarizó una suspensión de 1×10^7 conidios/mL y se inoculó 1 mL de esta suspensión en 10 gramos de arroz previamente esterilizado, se incubó a 28°C durante 12 días. También se evaluó el efecto que tiene el reutilizar el sustrato en la producción de conidios como el efecto en la viabilidad, se realizó el reuso ya que únicamente se consume el 5% en cultivo en medio sólido, para lo cual se evaluaron las siguientes proporciones de arroz fresco y arroz reutilizado una vez y dos veces Af:Ar y Af:Ar₂ (Arroz fresco : Arroz reutilizado) respectivamente. La proporción fueron las siguientes para el arroz reutilizado una vez y dos veces: 100:0, 70:30, 30:70 y 0:100.

1. Marco Teórico

1.1 Producción de alimentos y problemas de la salud

Debido a que la población mundial aumento 3.7 veces durante el siglo XX, siendo de 6 mil millones de personas y se prevé que aumente a 7.5 mil millones en el año 2020 y para mediados de este siglo se espera que llegue a 9 mil millones de personas (Godfray *et al.*, 2010). En estudios recientes se sugiere que el mundo necesitará más alimento, entre un 70% a 100% más para 2050 (Baulcombe *et al.*, 2009), por lo que surge la necesidad de nuevos métodos de producción de alimentos teniendo en cuenta la necesidad de poner un freno a los efectos negativos en la producción de alimentos para el medio ambiente, tales efectos son ocasionados por el uso de fertilizantes y plaguicidas (Godfray *et al.*, 2010). La agricultura se ha intensificado a nivel mundial durante los últimos 50 años, debido al aumento de la mecanización, los cambios en el calendario de las operaciones agrícolas, la conversión de los pastizales en tierras de cultivo y el aumento de los insumos agroquímicos (Stanton *et al.*, 2018). Esto último, trae como resultado la resistencia de los insectos. La resistencia de los insectos a los plaguicidas se ha convertido en un problema, al igual que las amenazas ambientales y de las asociadas a la salud humana como la transferencia de plaguicidas al agua y al aire, los cuales, ocasionan una tasa elevada de enfermedades crónicas, tales como: diferentes tipos de cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, defectos de nacimiento y trastornos reproductivo. El contacto a largo plazo puede afectar diferentes órganos del cuerpo incluyendo el sistema nervioso, endocrino, inmunológico, reproductivo, renal, cardiovascular y respiratorio (Mostafalou y Abdollahi, 2013; Kongtip *et al.*, 2018). Como alternativa surge el manejo integral de plagas (IPM) por sus siglas en inglés, el IPM hace uso de la resistencia de la planta huésped y el control biológico (Matson *et al.*, 1997)

1.2 Control biológico

El control biológico se divide en cuatro tipos: El clásico, inundativo, inoculativo y conservacional. El control biológico clásico, centra la atención en las plagas invasivas, utilizando un enemigo natural, el cual se obtiene del lugar donde proviene la plaga y se introduce en el nuevo ambiente donde la plaga se encuentre, esperando que el organismo introducido se establezca permanentemente. El control biológico inundativo consiste en la

producción a gran escala del enemigo natural y una amplia distribución en el medio ambiente para suprimir la plaga sin la colonización permanente del agente de biocontrol liberado. El control biológico inoculativo se puede considerar como intermedio entre los enfoques clásicos e inundativos. El enemigo natural es liberado con la expectativa de reciclarlo aunque no sea un establecimiento permanente por lo que se tendrá que ser liberado por varias temporadas o años. El control biológico conservacional consiste en usos de enemigos naturales propios del ambiente (Blackburn *et al.*, 2016). Un organismo indeseable puede eliminarse localmente o, lo que resulta mejor, su población puede reducirse a una escala que no cause daño económico. La erradicación completa de plagas resulta ambiciosa y en la mayoría de los casos trae problemas ecológicos. Si un enemigo natural elimina completamente a una plaga, éste quedaría sin alimento para continuar su desarrollo. El control biológico busca reducir las poblaciones de la plaga a una proporción que no cause daño económico, y permite una cantidad poblacional de la plaga que garantiza la supervivencia del agente controlador. Este agente mantiene su propia población y previene que la plaga retorne a grados poblacionales que causan daño (Hajek, 2004).

1.3 Plaga

En el contexto agrícola se denomina plaga a cualquier organismo que a determinada densidad poblacional causa daño sobre una especie animal o vegetal, teniendo una disminución en la producción y, por lo tanto, se tiene una pérdida económica (Nicholls, 2008; Aluja y Mangan, 2008)).

1.4 Agentes de control biológico

Los agentes de control biológico, incluidos los microorganismos, pueden ser usados en diversas estrategias para el control de plagas. En el enfoque del control biológico clásico, un agente externo está relacionado con el control de una plaga externa. El agente externo es seleccionado por su habilidad para el control de la plaga en su lugar de origen y es introducido para reestablecer el equilibrio en una nueva región. El agente externo se va a propagar por medio de la transferencia vertical y horizontal de genes, aún después de haber controlado la plaga, pronto el agente externo llegará a un equilibrio con su huésped. Se toman medidas para mejorar la eficiencia de los agentes presentes en la región, ya que son insuficientes en número para afectar significativamente la población de la plaga (Jaronski, 2012).

1.5 Patógenos

Los patógenos son microorganismos parasíticos y causan enfermedad a sus huéspedes, como los insectos plaga. En las enfermedades infecciosas se encuentran involucrados microorganismos patógenos. Éstos generalmente invaden y se multiplican en el insecto y se dispersan infectando otros insectos. Además, se transmiten por medio de: contacto, ingestión, vectores y a veces de padres a la nueva generación. Los patógenos son formas procariotas, como las bacterias y virus; y en el caso de hongos y protozoarios constituyen formas eucariotas. Los nematodos y microorganismos más grandes y complejos se incluyen dentro de los patógenos debido al gran número de especies que causan enfermedades en los insectos. No todos los microorganismos causan infección después de que alcanzan el hemocele de los insectos. Esta incapacidad para producir infección puede deberse a la resistencia característica del hospedero, o bien, a la inhabilidad del microorganismo para sobrevivir y multiplicarse en el medio ambiente del hospedero. Los microorganismos que causan infección se dividen en patógenos potenciales, facultativos y obligados (Nicholls, 2008):

- Patógenos potenciales. Microorganismos incapaces de invadir al hospedero por medio de la pared cuticular o del tracto digestivo, requieren de la ayuda del medio ambiente para que reduzca la resistencia del hospedero, o que favorezca la habilidad del microorganismo de invadir el hospedero.
- Patógenos facultativos. Microorganismos que no requieren de un insecto debilitado. Ellos pueden invadir el insecto, y su reproducción puede ocurrir en el insecto. Sin embargo, la sobrevivencia de ambos, potenciales y facultativos, no depende totalmente del insecto. Éstos son patógenos fáciles de cultivar sobre medios artificiales (hongos y bacterias).
- Patógenos obligados. Microorganismos que requieren un insecto vivo para sobrevivir y multiplicarse. Pueden darse fuera del insecto en estado latente: como esporas, quistes, inclusiones virales, etc. Los patógenos obligados son: virus, protozoos y ciertos hongos y bacterias.

1.6 Hongos entomopatógenos

Los hongos son organismos eucariontes, con nutrición por absorción, carecen de clorofila, su reproducción puede ser asexual o sexual. La célula del hongo suele estar compuesta de celulosa quitina y glucanos. Las hifas forman parte de la estructura del hongo a modo de hilos de células ramificados, al conjunto de hifas se le llama micelio. Los hongos liberan enzimas hidrolíticas que digieren sustratos externos, después absorben los productos solubles (Prescott *et al.*, 2004; Montesinos-Matías *et al.*, 2011).

Los hongos entomopatógenos constituyen una pequeña porción de los bioplaguicidas, sin embargo, el incremento en el costo de producción de los plaguicidas químicos, la resistencia desarrollada por las plagas y la presión que existe por reducir la contaminación en el ambiente, paulatinamente han aumentado el interés por estrategias alternativas para el manejo de plagas. Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos en 100 géneros en el mundo, pero pocos son estudiados intensivamente, los plaguicidas comerciales (micoplaguicidas) están basados en conidios de los *Ascomycota* (*Beauveria*, *Metarhizium*, etc.). Los hongos por su forma característica de infección, son los microorganismos más importantes que infectan insectos como: *Lepidóptera*, *Homóptera*, *Himenóptera*, *Coleóptera* y *Díptera* (Nava-Pérez *et al.*, 2012; Van Driesche *et al.*, 2007).

La mayoría de los hongos no invaden hospederos a través del aparato digestivo aún si los conidios son ingeridos, las infecciones fúngicas empiezan después de que los conidios u otros estados infecciosos hacen contacto al azar con un hospedero susceptible o por la aplicación directa a la plaga. Los conidios aéreos contienen hidrofobinas (Holder *et al.*, 2007), lo que favorece la unión en superficies hidrofóbicas, débilmente polares e hidrófilos (Holder y Keyhani 2005). La espora o el conidio es la unidad más infecciosa, la cual mata al hospedero después de que ocurra el ciclo infectivo, siempre que el hongo supere al sistema de defensa del insecto (Thomas y Read, 2007). Enseguida del contacto, debe ocurrir la adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del hospedero (a menudo es ayudada por compuestos mucilaginosos), después de ser depositada en la cutícula del hospedero y bajo condiciones apropiadas de humedad, se produce un tubo germinal que abre brecha en el integumento del hospedero. Las hifas (tubo germinativo) liberan enzimas digestivas sobre la

cutícula como se observa en la **Figura 1**. El hongo se reproduce rápidamente después de entrar a la cavidad del cuerpo de un insecto y mata al hospedero ya que durante el proceso de invasión produce cuerpos hifales y protoplastos que carecen de una pared celular, por lo que no son detectados por los hemocitos del insecto (Nava-Pérez *et al.*, 2012; Van Driesche *et al.*, 2007).

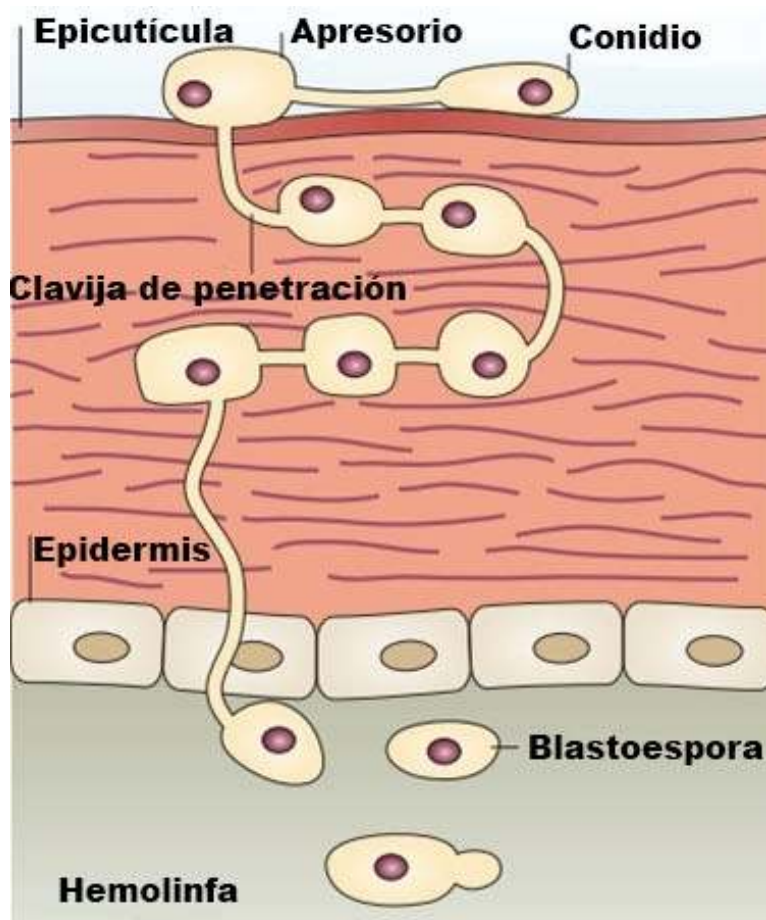


Figura 1.-Ciclo infeccioso de hongos entomopatógenos en cutícula de insecto: A: Primero el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, entonces los conidios germinan y generan el tubo germinativo perforando la cutícula, se da un crecimiento vegetativo en el interior del hospedero y en su exterior son producidas las esporas después de la muerte del hospedero. La infección es exitosa solo si el hongo puede superar la respuesta inmune del insecto (Thomas y Read, 2007).

1.7 *Beauveria bassiana*

El género *Beauveria* pertenece a la clase *Sordariomycetes* (*Phylum Ascomycota*) y está distribuida en todo el mundo. El estado infectivo es el conidio, que germina y penetra la cutícula del insecto después de adherirse a ella. Dentro del insecto se forma el micelio que produce metabolitos, el metabolito secundario mejor estudiado es la bauvericina, la cual mostró tener propiedades antibacteriales, antitumorales, antifúngicas e insecticida (Wang y Xu, 2012). La muerte del insecto es ocasionada por la combinación de metabolitos producidos durante el crecimiento del micelio del hongo y la ruptura de tejidos del insecto (Bukhari *et al.*, 2013).

1.8 *Metarhizium* spp.

El género *Metarhizium* fue establecido primero por Sorokin (1883) él lo llamó hongo de la muscardina verde, fue encontrado en Ucrania y descrito por Metschnikoff en 1879. La especie *Metarhizium anisopliae* fue descrita originalmente por Metschnikoff en 1879. Pero fue Sorokin, en 1883, quien le asignó el género *Metarhizium*. Este hongo infecta a una amplia gama de huéspedes (insectos); sin embargo, la gama de huéspedes es más restringido que el de *B. bassiana*. Fue presentado por Veen (1968) con un registro de 204 especies de insectos infectados de forma natural (Taylor & Zimmermann, 2007). *M. robertsii* y *M. acridum* presentan entre 85 y 52 genes esenciales supuestamente implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre estos metabolitos se encuentran destruxinas, fusarina (NG39x), citocalasina y swainsonina los cuales son activos farmacéuticamente y tienen actividad insecticida (Gibson *et al.*, 2014).

1.9 Sistemas de producción de hongos entomopatógenos a gran escala

En la literatura, únicamente se describen dos sistemas de producción, el primer sistema consiste en utilizar bolsas con arroz y el segundo sistema se le conoce como de charolas fluidizadas, en el cual se coloca el sustrato sobre ellas y se pasa una corriente de aire por arriba del sustrato. Estos sistemas se implementan por su facilidad de aplicación y por sus bajos costos de inversión (Van Breukelen *et al.*, 2011).

La mayoría de los micoinsecticidas disponibles en el mercado están basados en cepas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosurosea*. Estas especies producen grandes cantidades de conidios aéreos en cultivo en medio sólido (CMS) (Angel-Cuapio *et al.*, 2015), una dificultad que presenta el cultivo en medio sólido es la contaminación por bacterias, la cual se puede evitar si la fase lag fuera más corta o casi nula (Jaronski y Jackson, 2012), el uso del cultivo bifásico es una alternativa para disminuir el tiempo de latencia, el cual consiste en usar conidios germinados en el cultivo en medio sólido (Gouli, Gouli, y Kim, 2014; Machado *et al.*, 2010).

El producir grandes cantidades de conidios de hongos entomopatógenos es primordial ya que la dosis recomendada es de 5×10^{12} conidios/hectárea para el control de las plagas en campo (Jenkins *et al.*, 1998). No sólo el producir grandes cantidades de hongos entomopatógenos es de suma importancia, un factor importante es la calidad de los conidios, cuantificada como viabilidad, la cual presenta una ventaja a la germinación de conidios. La germinación cuantifica todos los conidios que pueden formar el tubo germinativo en las esporas (Faria *et al.*, 2015; Montesinos-Matías *et al.*, 2011), mientras que la viabilidad descarta los conidios que pueden formar el tubo germinativo y que no pueden formar unidades formadoras de colonia (UFC) (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios se centran en condiciones de cultivo, para mejorar la producción de los conidios, así como su calidad y presentar buena resistencia contra condiciones ambientales, estas condiciones utilizan diferentes tipos de sustrato, varían el contenido de humedad del medio, cambian la concentración del inoculo inicial, usan soportes que aumente la porosidad y por lo tanto mejoren la transferencia de oxígeno, (Angel-Cuapio *et al.*, 2015; Nuñez-Gaona *et al.*, 2010), se han probado diferentes concentraciones de oxígeno en los cultivos, los cuales tienen un impacto en la producción de conidios, la viabilidad, la hidrofobicidad y la virulencia (García-Ortiz *et al.*, 2015). Se ha estudiado la aplicación de estímulos combinados como la luz (día-obscuridad) y pulsos de oxígeno en los conidios de diversos hongos, en los que se muestra efectos como la producción de conidios, la patogenicidad, viabilidad e hidrofobicidad, las cuales varían dependiendo de la cepa (Rodríguez Gómez *et al.*, 2015). Cabe señalar que algunas especies de hongos entomopatógenos presentan mayor virulencia a temperaturas bajas, debido a que estos patógenos se adaptaron a estas condiciones (Ferguson *et al.*, 2016) por lo que al introducirse en condiciones ambientales distintas la eficiencia de los conidios

se vería afectada por los factores abióticos ambientales, como lo son la humedad, la temperatura y la radiación solar(UV-A y B) (Mascarin y Jaronski, 2016).

2. Antecedentes

La calidad de los conidios es un factor importante en la producción de esporas de hongo entomopatógenos, por lo que es necesario usar cepas que estén aclimatadas para que los parámetros de calidad como es la infectividad no se vean afectados (Ferguson *et al.*, 2016). Al tener esporas con una germinación lenta se presentarían efectos negativos en el cultivo en medio sólido y en su aplicación, ya que la fase lag sería muy extensa, dando lugar al crecimiento bacteriano y a una infectividad menor, y con ello un mal desempeño en campo (Faria *et al.*, 2015; Jaronski y Jackson, 2012).

Para la producción de esporas de hongos entomopatógenos como *Beauveria* y *Metarhizium*, el arroz es el sustrato que se utiliza con mayor frecuencia, por su capacidad de retención de humedad y por sus características físicas como la firmeza además de su disponibilidad y su precio (Jaronski y Jackson, 2012; Lopez-Perez *et al.*, 2015). Se han reportado rendimientos de (2.2×10^9) conidios por gramo de arroz) en cultivo en medio sólido para *Beauveria* usando arroz precocido como sustrato (Tarocco *et al.*, 2005) y para *Metarhizium* de (1×10^9) conidios por gramo de arroz) en el mismo sustrato (Barra-Bucarei *et al.*, 2016). Al ser el arroz el insumo principal en la producción de conidios surge la necesidad de reutilizar el sustrato, ya que Pham *et al.*, (2010) menciona que para la producción de esporas únicamente se consume el 5% del sustrato como mínimo ya que otros autores reportan que se consume 20% del sustrato (Ye *et al.*, 2006).

Algunos autores mencionan que el cultivo bifásico es una tecnología adecuada para la producción en masa de esporas de *Lecanicillium lecanii*, ya que con este método no afecta la viabilidad, ni el rendimiento de las esporas (Machado *et al.*, 2010). El cultivo bifásico incluye una primera fase en cultivo líquido para germinar las esporas o los conidios, de donde se obtiene el inóculo. Además, este proceso facilita la colonización del hongo en el sustrato, reduciendo así el riesgo de contaminación en el cultivo sólido. Este proceso asegura una colonización uniforme en el sustrato, además aumenta y acelera la producción de conidios, así como la disminución del tiempo de incubación (Jenkins *et al.*, 1998).

3. Justificación

Al utilizar cepas nativas de hongos entomopatógenos se tiene la certeza que resistirán las condiciones climáticas del lugar, por ende, tendrán un mejor desempeño que una cepa proveniente de otra región geográfica, como las que se usan en formulaciones comerciales; además de que la cepa nativa no estará en competencia con los microorganismos del lugar. Una manera de disminuir costos de producción es la reutilización del arroz, sustrato preferido en la producción de conidios de hongos entomopatógenos. En los cultivos sólidos con arroz como sustrato sólo se consume entre el 5% y 20% del sustrato (Pham *et al.*, 2010; Ye et al., 2006), de ahí la importancia en reutilizar al menos parte del sustrato para la producción de conidios. Las propuestas de cultivos sólidos basados en la reutilización del arroz, mejorarán el proceso de producción de conidios manteniendo la calidad, así como la disminución de costos de producción.

4. Hipótesis

Al utilizar diversas proporciones de arroz fresco con arroz reutilizado, se obtendrá un nivel de conidiación al menos igual al obtenido en el arroz fresco, sin que la calidad de los conidios se afecte.

5. Objetivos

5.1 General

Determinar el efecto que tienen las proporciones de arroz reutilizado en la producción de conidios por hongos entomopatógenos.

5.2 Particulares

1. Observar el efecto de conservación a mediano y largo plazo de las cepas de hongos entomopatógenos.
2. Determinar el efecto del cultivo bifásico en la producción de conidios.
3. Establecer las proporciones de arroz nuevo: usado que conserven la calidad y los niveles de conidiación.

6. Materiales Y Métodos

6.1 Material biológico

Los hongos utilizados fueron *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj-2.1 y *Beauveria bassiana* Tac-1, los cuales fueron aislados en las delegaciones Xochimilco, Cuajimalpa y Tláhuac, respectivamente. Estas cepas fueron aisladas por Estefes-Chávez (2015).

6.2 Reactivación

Para la reactivación de las cepas de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* Tac-1, *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 y *Metarhizium robertsii* Cuj-2.1 se realizó lo siguiente. Se propagó para cada cepa en medio SDA, y se extrajeron los conidios a los 7 días de cultivo con una solución de Tween 80 al 0.05%. Posteriormente, se tomaron larvas de *Tenebrio molitor*, se sumergieron por 1 minuto en NaClO al 1% y se lavaron las larvas por 2 minutos en agua destilada estéril. A continuación, las larvas se sumergieron en una suspensión 1×10^8 conidios/mL y se colocaron en cámaras húmedas (Scully y Bidochka, 2005), en el momento que las larvas estaban micosadas se tomó con una asa estéril una pequeña muestra de conidios de la superficie del insecto, la cual se diluyó para posteriormente realizar una siembra por estría en caja Petri con medio SDA, al tener las colonias separadas se tomó una de estas colonias y se propagó en cajas Petri con medio SDA para su conservación, este procedimiento se realizó para cada cepa.

6.3 Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo, el medio SDA (**Tabla 1**) para la propagación de las cepas *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj-2.1 y *Beauveria bassiana* Tac-1 y un medio líquido (**Tabla 2**) para el cultivo bifásico de estas cepas. Y Para cuantificar la calidad de los conidios medida como viabilidad se usó el medio SDA con desoxicolato de sodio (**Tabla 3**).

Tabla 1. Formulación del medio SDA.

Agar Dextrosa Sabouraud	
Reactivo	(g/L)
Dextrosa	40
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5
Agar	15

Tabla 2. Composición del medio MS

Maltosa Sabouraud	
Reactivo	(g/L)
Maltosa	20
Peptona de carne	2.5
Extracto de levadura	0.5

Tabla 3 Formulación del medio SDA con desoxicolato de sodio.

Agar Dextrosa Sabouraud	
Reactivo	(g/L)
Dextrosa	40
Peptona de carne	5
Peptona de caseína	5
Agar	15
Desoxicolato de sodio	0.25

6.4 Conservación de microorganismos

6.4.1 A corto plazo

Las cepas *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj-2.1 y *Beauveria bassiana* Tac-1, se inocularon en cajas Petri con medio SDA, se incubaron durante 7 días a 28°C con fotoperiodo luz-obscuridad 12:12 h. En el séptimo día, se conservaron las cepas en agua desionizada estéril (López Lastra *et al.*, 2002), se almacenaron a 4°C en viales de vidrio con capacidad de 10 mL (**Figura 2**), los cuales contenían 4 mL de agua desionizada y se

colocaron 4 trozos de agar de 5mm² para las tres cepas. Estos conservados se ocuparon para la propagación de cada cepa y para realizar pruebas de viabilidad que posteriormente se describen.



Figura 2. Vial de vidrio con trozos de agar colonizado.

6.4.2 Largo plazo

Las cepas *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj-2.1 y *Beauveria bassiana* Tac-1 se cultivaron en medio SDA a 28°C durante 7 días, se realizó la extracción de los conidios con 30 mL de Tween 80 al 0.05%, la suspensión se concentró pasando el contenido de la suspensión a otro cultivo la cual se filtró con gasa estéril y posteriormente se estandarizó a una concentración de 1×10^8 conidios/mL, después de obtener esta suspensión se agregó leche descremada (Svelty) al 10% hasta obtener una concentración de 1×10^7 conidios/mL. La leche descremada (Svelty) al 10% se agregó como agente crio protector (Hernández-Rosas, 2006) que previamente fue esterilizada a 120°C por 15 min, por otro lado, se esterilizaron ampolletas (Wheaton) (**Figura 3**) con capacidad para 10 mL a 120°C por 15 min; finalmente la suspensión se sometió a agitación en vórtex por 1 min para asegurar su homogeneidad. En un ambiente estéril se agregó 1 mL de suspensión a cada ampolleta, con lo que la concentración de conidios en cada ampolleta quedó de 1×10^7 conidios/ mL, la suspensión de conidios se congeló a -195°C con nitrógeno líquido. Las ampolletas tapadas con algodón se colocaron en una liofilizadora durante 6 horas a -50°C, a 10 micrones de Hg,

por último, se retiraron los viales y se sellaron con mechero, los liofilizados se conservaron a temperatura ambiente (Toegel *et al.*, 2010).



Figura 3. Ampolletas (Wheaton) con capacidad para 10 mL.

6.5 Sustrato para el cultivo en medio sólido.

Para la producción de esporas se usó como sustrato arroz precocido de la marca verde valle tanto para el cultivo inoculando únicamente esporas como para el cultivo bifásico, además se reutilizo este sustrato para observar el efecto que este tendría en la producción de esporas.

6.5.1 Descripción

Para las cinéticas de producción de esporas tanto para el cultivo que se inoculo con esporas sin germinar como para el cultivo bifásico el arroz se trató de la siguiente manera.

Se pesaron 10 gramos de arroz precocido de la marca Verde Valle en frascos de tipo Gerber de 125 mL (**Figura 4**), se colocó una tapa de papel aluminio y se esterilizaron a 120 °C durante 15 minutos. Se colocaron suficientes frascos como para tener controles de esterilidad y para medir la humedad que presentaba en promedio los lotes de arroz, posterior a su enfriamiento. Se cuantifico la humedad del sustrato por medio de la termobalanza, para ajustar la humedad del sustrato a 28% se usó la **Ecuación 1**. Dónde: X = Masa de agua para el ajuste; MS = Materia seca; %H= Porcentaje de humedad deseado para el ajuste; MH = Materia humedad.



Figura 4. Frasco de 125 mL tipo Gerber con 10 gramos de arroz.

$$X = \left(\frac{MS}{1 - \frac{\%H}{100}} - MS \right) - (MH - MS)$$

Ecuación 1 Ecuación para ajustar el contenido de humedad del sustrato

6.5.2 Tratamientos

El arroz que se usó para el cultivo bifásico como para el inoculado únicamente con esporas y en las proporciones 100:0 Af:Ar y Af:Ar₂ (Arroz fresco : Arroz reusado y (Arroz fresco : arroz reusado por segunda vez) no se trató, únicamente se usó el sustrato después de esterilizar y de ajustarse la humedad a 28%.

Sustrato reutilizado

El arroz reutilizado una sola vez es el arroz proveniente de la cinética de producción de conidios después de la extracción de conidios con 30 mL de Tween al 0.05%, el arroz sobrante de la cinética se lavó con 60 mL (**Figura 5**), con esto se asegura la extracción de la mayoría de los conidios (Angel-Cuapio, 2011) y se secó en la estufa durante 6 horas a 65 °C. Para la producción de la cinética de arroz reutilizado por segunda ocasión se usó la metodología mencionada pero partiendo del arroz residual del primer reuso.



Figura 5. Imágenes del sustrato: a) Grano de arroz antes de la cinética de producción de conidios, b) Grano de arroz colonizado por *M. robertsii*, c) Grano de arroz después del lavado y secado.

6.6 Propagación

La propagación se realizó en medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), por ser un medio rico y además por ser un medio apropiado para el crecimiento de hongos (Jaronski y Jackson, 2012), cuya formulación se observa en la **Tabla 1**. El medio se esterilizó a 120 °C durante 15 minutos y se inocularon las tres cepas de hongos entomopatógenos (**Figura 6**) que previamente se reactivaron y se conservaron en viales, una vez inoculado con cada cepa se incubó por 7 días a 28°C con fotoperiodo luz-obscuridad 12:12.

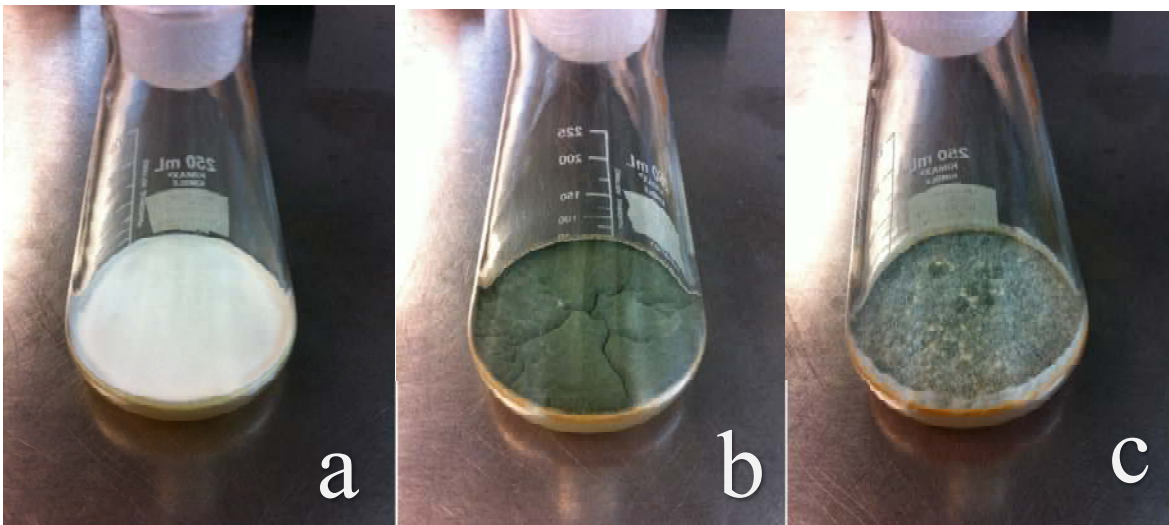


Figura 6. Cepas de hongos entomopatógenos propagados en medio SDA, a) *Beauveria bassiana* Tac-1, b) *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y c) *Metarhizium Robertsii* Cuj 2.1.

6.7 Cultivo bifásico

Para el inicio del cultivo bifásico se realizaron con medio Maltosa Sabouraud (MS) cuya formulación se muestra en la **Tabla 2**. El medio ayuda a la germinación de las esporas y así disminuir el tiempo de cultivo (Thomas *et al.*, 1987).

7. Análisis comparativo del cultivo bifásico y sólo esporas

El análisis comparativo se realizó con la finalidad de corroborar si en efecto el uso del cultivo bifásico aumentaba la producción de esporas y disminuía los tiempos de producción como se menciona en la literatura (Jenkins *et al.*, 1998; Mascarin *et al.*, 2010). Para lo cual se usó un tratamiento sobre las esporas, el cual consistía en usar las esporas germinadas durante 10 horas en medio MS y después compararlas con la producción de esporas sin tratamiento a un mismo tiempo para cada cepa.

7.1 Cultivo bifásico

Jenkins *et al.*, (1998) mencionan que el uso de un cultivo de dos fases disminuye los tiempos de producción, y aumenta la producción de esporas de hongos entomopatógenos (Mascarin *et al.*, 2010). El cultivo bifásico consistió en una extracción de conidios con Tween 80 al 0.05% de un inóculo de 7 días de incubación a 28°C, el cual se estandarizó una suspensión de 1×10^7 conidios/mL. La suspensión de conidios contenía medio MS con una relación 2:1 (medio MS: Tween 80 al 0.05%) a manera de saber siempre la concentración del medio MS, y que este no tuviera efecto alguno en la reproducibilidad de los experimentos. La suspensión de 1×10^7 conidios/mL se incubó a 28°C durante 10 horas a 200 rpm, después se inoculó 1 mL de la suspensión en 10 g de arroz fresco que previamente fue esterilizado, y se ajustó la humedad a 28%, posteriormente se realizó la cuantificación de los conidios en el día de máxima producción de conidios para cada una de las cepas (Faria *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 2008).

7.2 Inoculación directa sólo con esporas

Para el tratamiento inoculado sólo con esporas se realizó lo siguiente: Una extracción de conidios con Tween 80 al 0.05% se estandarizó en una suspensión de 1×10^7 conidios/mL y se inoculó 1 mL de esta suspensión en 10 g de arroz previamente esterilizado ajustando la

humedad a 28%. Se incubó a 28°C (Angel-Cuapio *et al.*, 2015) y se realizó la cuantificación de los conidios en el día de máxima producción para cada cepa.

7.3 Cinética de producción de conidios

Se utilizó arroz precocido de la marca Verde Valle como sustrato para el cultivo en medio sólido, por ser el sustrato más usado para la producción de conidios (Jenkins *et al.*, 1998), además de ser un sustrato homogéneo y de esta manera no afectar la reproducibilidad de los rendimientos de los conidios, al igual que su calidad (Bellon-Maurel *et al.*, 2003). Las tres cepas fueron cultivadas en arroz, en botellas tipo Gerber de 125 mL. A las cuales se agregaron 10 gramos de arroz esterilizado y se les ajustó la humedad a 28% después de que las botellas estaban a temperatura ambiente, se inóculo en todas las unidades experimentales 1 mL de una suspensión cuya concentración era de 1×10^7 conidios/mL de conidios (germinados o sólo esporas) lo que equivale a una concentración de 1×10^6 conidios/gramo*sustrato seco inicial (conidios/gssi), la germinación de los conidios fue de 10 horas ya que conidios con una germinación de 16 horas o menos presentan mayor virulencia (Faria *et al.*, 2015), además ya que si el tiempo era mayor a 10 horas la cuantificación de los conidios se complicaba, por la formación de hifas. Las botellas se cubrieron con tapas de papel aluminio, se realizó conteo de conidios a los 4, 7, 10 y 12 días para las tres cepas.

7.3.1 Extracción de conidios

Para la cuantificación de los conidios, se adicionaron 30 mL de Tween 80 al 0.05% a las unidades experimentales y se agitó con agitador magnético durante 10 minutos. EL conteo de los conidios se realizó con cámara de Neubauer con el objetivo 40X del microscopio (BOECO). La producción de conidios se reportó como conidios por gramo de sustrato seco inicial (conidios/gssi).

7.3.2 Viabilidad

La viabilidad de los conidios de cada una de las cepas se realizó inoculando 30 μ L de una suspensión de 1×10^4 conidios/mL sobre cajas Petri con agar Dextrosa Sabouraud y desoxicolato de sodio (0.25 g/L) que previamente fue esterilizado a 120°C durante 15 minutos antes de ser inoculado (Montesinos-Matías, *et al.*, 2011). Por lo que, en cada caja Petri se encontraban aproximadamente 300 conidios, para cada cepa se realizaron triplicados.

Después de 72 horas de incubación a 28 °C se contaron las colonias formadoras y la viabilidad se reportó como porcentaje de viabilidad (Nuñez-Gaona *et al.*,2010).

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

Donde:

V=viabilidad de los conidios (%)

n= Número de colonias

7.4 Reuso del arroz

La metodología empleada para reutilizar el arroz para las tres cepas fue la siguiente: Se inocularon 12 botellas con 10 gramos de arroz que previamente fueron esterilizadas para cada una de las cepas como se menciona en la sección 7.3, con sus respectivos controles. Se realizó la extracción de los conidios en el día de máxima producción dependiendo de la cepa, posterior a su extracción se realizó un lavado y secado al sustrato y se llenaron 12 botellas con 10 gramos con el arroz reutilizado que posteriormente se esterilizó y se le ajustó la humedad a 28%, para ser inoculado nuevamente usando el cultivo bifásico o sólo esporas, dependiendo de los resultados que se obtuvieron de cada cepa. Para corroborar que las esporas residuales en los sustratos no eran capaces de formar una UFC, se usaron tres controles a los cuales se les ajusto la humedad, estos controles no se inocularon y posteriormente se incubaron.

7.4.1 Primer reuso

Para la cinética de producción de esporas con arroz reusado una sola vez se realizó lo siguiente: Se inocularon 12 botellas con 10 gramos de arroz seco completamente fresco como se menciona en la sección 7.3, después de esterilizar e inocular usando sólo esporas o cultivo bifásico (dependiendo de los resultados obtenidos), se incubó este sustrato como se menciona en la sección 7.4, posteriormente se detuvo la cinética dependiendo de su día de máxima producción, en el momento en que se detuvo la cinética , se realizó una extracción con 30 mL de Tween 0.05% y se lavó con 60 mL de agua, con esto se asegura la extracción de la mayoría de los conidios (Angel-Cuapio, 2011) y se secó en la estufa a 65°C durante 6 horas. Posteriormente se realizó la cinética de producción de esporas para el primer reuso, usando el arroz previamente lavado y secado, se pesó en diversas proporciones de arroz fresco (Af)

y arroz reutilizado (Ar). Las proporciones Af:Ar evaluadas fueron: 100:0, 70:30, 30:70 y 0:100 con sus debidos controles tanto de la proporción 100:0 y 0:100, los controles de esterilidad no se inocularon. Se esterilizaron todas las botellas y posteriormente se inocularon y se ajustó el contenido de humedad.

7.4.2 Segundo reuso

Se realizó un segundo reuso del arroz (Ar_2), para el cual se utilizó el arroz que dejó al final la cinética del primer reuso (0:100) como sustrato y se inoculó como se menciona en la cinética de producción de conidios. Al terminar el tiempo de la cinética de producción de conidios para cada una de las cepas, se realizó la extracción de conidios en el día de máxima producción para cada cepa. El arroz se lavó, secó y se esterilizó, y nuevamente se realizaron cinéticas de producción de conidios usando las mismas proporciones de Af y Ar_2 . Con esta metodología se permite evaluar las dos variables de reuso de arroz (Ar y Ar_2) eliminando el error de la variación en la producción de conidios que se observa de lote a lote.

7.5 Cuantificación de la relación carbono/nitrógeno

Se realizó la cuantificación de la relación carbono y nitrógeno para arroz fresco (Af) y arroz reusado de cada cepa, en el caso del arroz reusado una sola vez, se trató como se menciona en la sección 7.4.1 para obtener el arroz limpio y seco, de acuerdo al manual de operación del fabricante. Para ello se redujo el tamaño de partícula del arroz con un mortero y se pasó por un tamiz de malla 100, el arroz molido se secó por 1h a 65°C. Se pesó entre 1.5 a 2.5 mg de cada muestra sobre una laminilla de 100 mg que se dobló y se introdujo al equipo PERKIN ELMER Serie II CHNS/O Analyser 2400 (**Figura 7**), que previamente fue calibrado con Acetanilida.



Figura 7. Equipo PERKIN ELMER Serie II CHNS/O Analyser 2400.

7.6 Porosidad

La porosidad se determinó para el arroz fresco (Af), arroz del primer reuso (Ar) y arroz del segundo reuso (Ar₂). Para el arroz reutilizado, tanto del primero como del segundo reuso, se determinó para cada cepa el valor de porosidad. Se pesaron 10 g de cada sustrato previamente esterilizado en botellas tipo Gerber después se midió la humedad en la termobalanza y se ajustó la humedad a 28% conforme a la **Ecuación 1** y se adicionó aceite mineral hasta alcanzar el tamaño de lecho del sustrato, se pesó la cantidad de aceite mineral que se adicionó y se calculó la porosidad reportada por Angel-Cuapio *et al.*, (2015). Donde V_t es el volumen total (mL) y V_s es el volumen ocupado (mL) sólo por la muestra, la diferencia entre V_t y V_s es el volumen vacío (mL).

$$\epsilon = \frac{V_t - V_s}{V_t}$$

7.7 Infectividad

Los parámetros de infectividad fueron obtenidos mediante bioensayos, permitiendo comparar y evaluar la calidad de los hongos entomopatógenos. Las pruebas de infectividad se realizaron con conidios cosechados en el día de mayor producción día 7 para Tac 1, y día 10 para Xoch 8.1 y Cuj 2.1, para todas las proporciones Af:Ar y para cada una de las tres cepas. La extracción de los conidios fue realizada como se describió en la sección 7.3.1. El insecto modelo para esta prueba fueron larvas de *Galleria mellonella* (Petmmal, México). Para cada proporción Af:Ar de cada cepa se usaron 15 cajas Petri y 5 cajas Petri como control, en cada caja de Petri se colocaron 12 larvas. Para los tratamientos Af: Ar se prepararon 20 mL de una suspensión con una concentración de 5×10^7 conidios/mL, en donde fueron sumergidas las larvas por 5 segundos (Fang *et al.*, 2009), las larvas control se sumergieron en una solución de Tween 80 (0.05%) por 5 segundos, después del tratamiento se alimentaron con dieta Wax Worm (PETMMAL, México), con la finalidad de evitar la muerte de las larvas por inanición y se incubaron con fotoperiodo 12:12 horas a 28 °C en cámara húmeda. La mortalidad fue registrada cada 24 h durante 12 días. Para el análisis comparativo de la infectividad de los diferentes tratamientos, los parámetros específicos de infectividad se estimaron de acuerdo con el modelo de decaimiento propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.*, (2009). Este modelo incluye, el tiempo en el que aparece la primera larva muerta (t_0), el tiempo letal 50 (LT₅₀), que es el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad y el porcentaje de sobrevivencia (S).

$$Y = 100 \quad \text{Si } 0 \leq t \leq t_0$$

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S; \quad \text{Si } t > t_0$$

Donde Y es el porcentaje de sobrevivencia (%) al tiempo t, k es la tasa específica de muerte (d^{-1}), t_0 es el tiempo en aparecer el primer muerto (d) y S es el porcentaje de sobrevivencia estimada asintótica (%).

7.8 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Se hizo un análisis comparativo de cada cepa para determinar el día de máxima producción de conidios; la variable que se analizó fue la producción (conidios/gssi), para la viabilidad se compararon los porcentajes de viabilidad a un tiempo, estas comparaciones se realizaron con el software PASW 18.0 versión para Windows para los análisis presentados.

8. Resultados y discusión de resultados.

8.1 Reactivación de las cepas

La resiembra consecutiva de hongos entomopatógenos trae consigo una disminución en los parámetros de producción de esporas, o bien en la calidad medida como la germinación o la viabilidad. Se realizó la reactivación de las cepas ya que algunas presentaron cambios en su morfología y una disminución en la producción de conidios (Eilenberg y Hokkanen, 2006; Scully y Bidochka, 2005). Se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* como se describe en la sección 6.2 de materiales y métodos. En el momento en que los insectos estaban micosados como se observa en la **Figura 8**, se aislaron las cepas en cajas de Petri con SDA y se realizaron los conservados a corto y largo plazo.

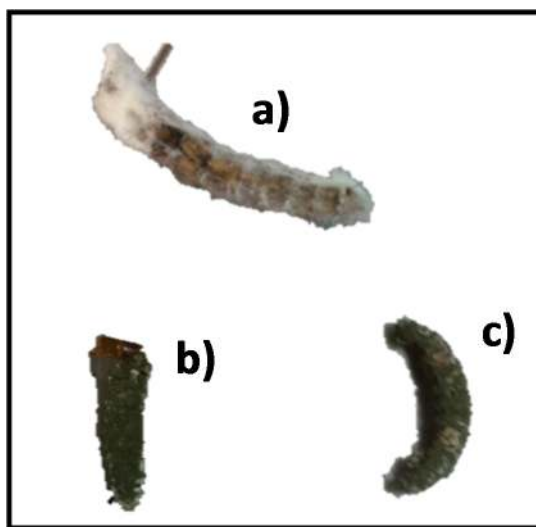


Figura 8. Larvas de *Tenebrio molitor* micosadas por cada hongo, a) *Beauveria bassiana* Tac 1, b) *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y c) *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1.

8.2 Conservación a corto plazo

Se realizó la conservación de las cepas en viales con agua desionizada y se almacenaron a 4 °C, las pruebas de viabilidad, en medio con desoxicolato de sodio, se realizaron a diferentes

tiempos (0, 1, 2, 3) meses como parámetro de calidad, de esta manera se observó cómo el tiempo afecta la viabilidad de las esporas en las cepas aisladas de la CDMX. Los datos que se presentan a continuación muestran el efecto gradual de la disminución de la calidad de los conidios conforme pasa el tiempo.

Los resultados que se presenta a continuación muestran el efecto del tratamiento de conservación y el efecto del manejo de la muestra, sobre la calidad de los conidios. En la **Tabla 4** se muestran las UFC para *Beauveria bassiana* Tac 1, se puede apreciar que en el tiempo igual a 1 mes se observa una viabilidad menor que a los 2 meses, lo cual puede atribuirse a un error experimental en la preparación de las muestras. Este método de conservación pone en evidencia que la cepa *B. bassiana* es muy sensible a este método, ya que a los 3 meses la viabilidad disminuyó 5.6 veces respecto a la viabilidad evaluada en 1 mes. Para la conservación de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, se presentaron algunos problemas técnicos y los datos que se presentan a continuación fueron los únicos datos confiables que se lograron obtener. Aún con los problemas que se presentaron para esta cepa, se puede ver que este método es realmente bueno porque al cabo de 7 meses la viabilidad disminuyó 2 veces respecto a la evaluada al inicio de la conservación y en comparación con la cepa *B. bassiana* este método es menos agresivo para *M. robertsii* Xoch 8.1 que la liofilización. También se muestran los datos de UFC para la cepa *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1, en los cuales se puede observar que el efecto de la conservación por el método a corto plazo no afecta la viabilidad en comparación a la cepa *B. bassiana*, ya que al tercer mes la viabilidad únicamente disminuyó 1.2 veces. Cabe aclarar que se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias en el tiempo cero pero los conteos no fueron lo suficientemente confiables por lo cual no se colocaron.

Tabla 4 Conservación a corto plazo en viales con agua desionizada para *Beauveria bassiana* Tac 1, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1.

Cepas	Tiempo (meses)	UFC
<i>Beauveria bassiana</i> Tac 1	1	39.11 ± 1.98
	2	81.66 ± 9.92
	3	6.77 ± 0.28

<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1	0	198.46 ± 34.14
	7	96.73 ± 8.72
<i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1	1	266.11 ± 3.82
	2	218.77 ± 12.53
	3	189.77 ± 16.50

8.3 Conservación a largo plazo

La prueba de viabilidad a largo plazo **Tabla 5** se realizó a los 2 meses para cada cepa, después de la liofilización. Este fue un método difícil de estandarizar ya que este método destruyó mucha de las esporas debido a que la esterilización eliminara el efecto crioprotector de la leche descremada y esto se refleja en las UFC que se obtuvieron. Se presentaron problemas al momento de estandarizar ya que si se tomaba una concentración de 1×10^4 conidios/mL no se presentaban UFC, pero si se tomaba el contenido total de la ampolleta liofilizada, las UFC no se podían contar ya que excedían las 300 UFC. Cabe resaltar que cada cepa podía generar una UFC a partir de la ampolleta y con esto mantener la cepa de cada hongo entomopatógeno. Se realizó la medición en el tiempo cero pero los datos no fueron confiables por lo que no se reportan.

Tabla 5 Unidades formadoras de colonias de *Beauveria bassiana* Tac 1, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 después de dos meses de liofilizar.

Cepas	UFC
<i>Beauveria bassiana</i> Tac 1	74 ± 7.211
<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1	----
<i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1	----

8.4 Cinética de producción de conidios

En seguida se mostrarán datos de cinéticas de producción de conidios de las cepas aisladas de la CDMX usando como sustrato y soporte arroz. Los conteos de la cinética se realizaron a los 4, 7, 10 y 12 días para cada cepa. Se realizó una comparación múltiple para encontrar

el tiempo en el cual no presentaban diferencia significativa ($\alpha=0.05$) con respecto a la producción de conidios (conidios/gssi). Además, se realizó la repetición del experimento (**Figura 10**) para corroborar la reproducibilidad de las cepas en la producción de conidios. Para la primera cinética de producción de conidios (**Figura 9**) los resultados fueron los siguientes: *Beauveria bassiana* Tac-1 no mostró diferencia significativa en el día 7 con una producción estimada de $9.38 \times 10^8 \pm 1.15 \times 10^8$ conidios/gssi, mientras que con *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 se encontró el valor máximo de producción a partir del día 10, su producción estimada fue de $4.01 \times 10^8 \pm 7.13 \times 10^7$ conidios/gssi, en este día no se presentaban diferencias significativas con respecto al día 12; para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 se encontró que en el día 10 la producción máxima estimada fue de $1.94 \times 10^8 \pm 2.67 \times 10^7$ conidios/gssi, además que no se presentaban diferencias significativas con respecto al día 12. Para la repetición del experimento que se muestra en la **Figura 10** se encontró que las tres cepas tienen el mismo comportamiento, en el cual *Beauveria bassiana* Tac-1 fue la de mayor producción, seguida por *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 en los dos experimentos. Las estimaciones del tiempo de máxima producción difieren en dos cepas con respecto al resultado de la primera cinética. Para *Beauveria bassiana* se encontró que no había diferencia significativa a partir del día 4 y para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 se encontró que a partir del día 7 no se encontraba diferencias significativas en cuanto a la producción. En comparación con un estudio de Garza López *et al.*, (2012) los valores máximos de producción para *Beauveria bassiana* 882.5 tuvieron una media de $(1.14 \pm 0.02) \times 10^9$ conidios/gssi al octavo día, siendo esta producción 1.21 veces más grande que la que se obtuvo con *Beauveria bassiana* Tac-1 cuya media estimada fue de $(9.38 \pm 1.15) \times 10^8$ conidios/gssi al séptimo día. Para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, quien fue la segunda mejor cepa en cuanto a la producción de conidios, al ser comparada con la producción de conidios de *M. anisopliae* CP-OAX (Angel-Cuapio, 2011), se encontró que era 1.02 veces mayor la producción de conidios de *M. robertsii* Xoch 8.1 que la cepa de *M. anisopliae* CP-OAX y al comparar la producción de *M. robertsii* Cuj 2.1 encontramos que es 2.01 veces menor que la reportada para la cepa de *M. anisopliae* CP-OAX. Además la cepa de *Beauveria bassiana* Tac-1 en el día 4 aumentó un poco más de un orden de magnitud, este comportamiento es similar al reportado por Nuñez-Gaona *et al.*, (2010) con una cepa de *Beauveria bassiana* sobre salvado de trigo.

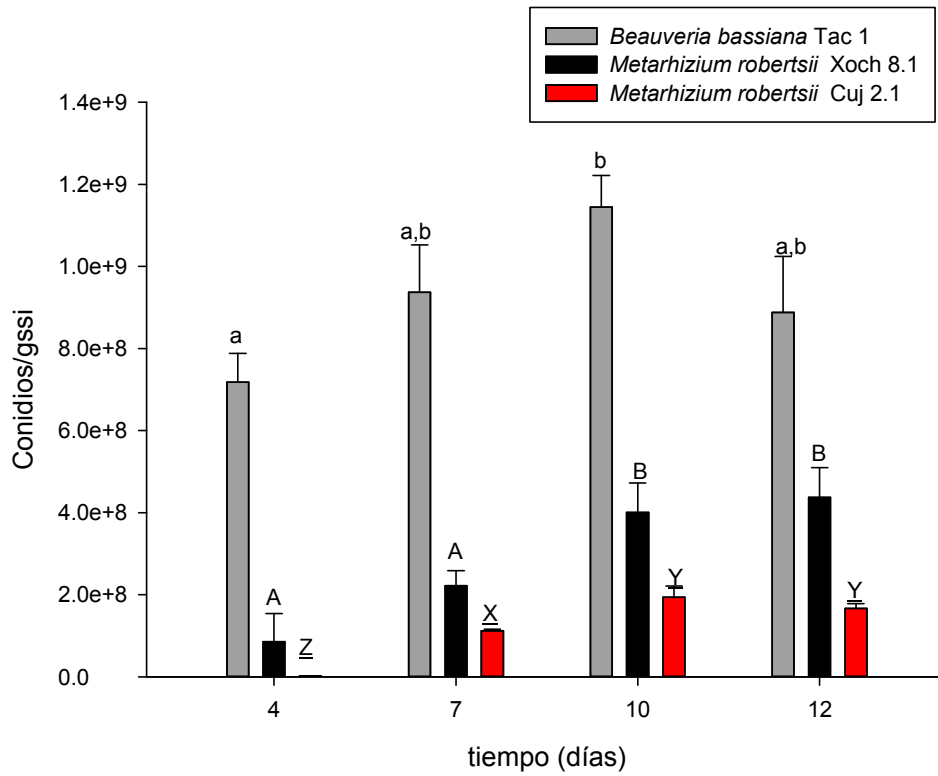


Figura 9. Cinética de producción de conidios y análisis de varianza para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 y para *Beauveria bassiana* Tac-1, en el análisis de varianza con ($\alpha=0.05$) se encontraron dos grupos para *Beauveria bassiana* Tac-1 (a y b) para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 fueron (A y B) y para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 fueron (Z, X y Y).

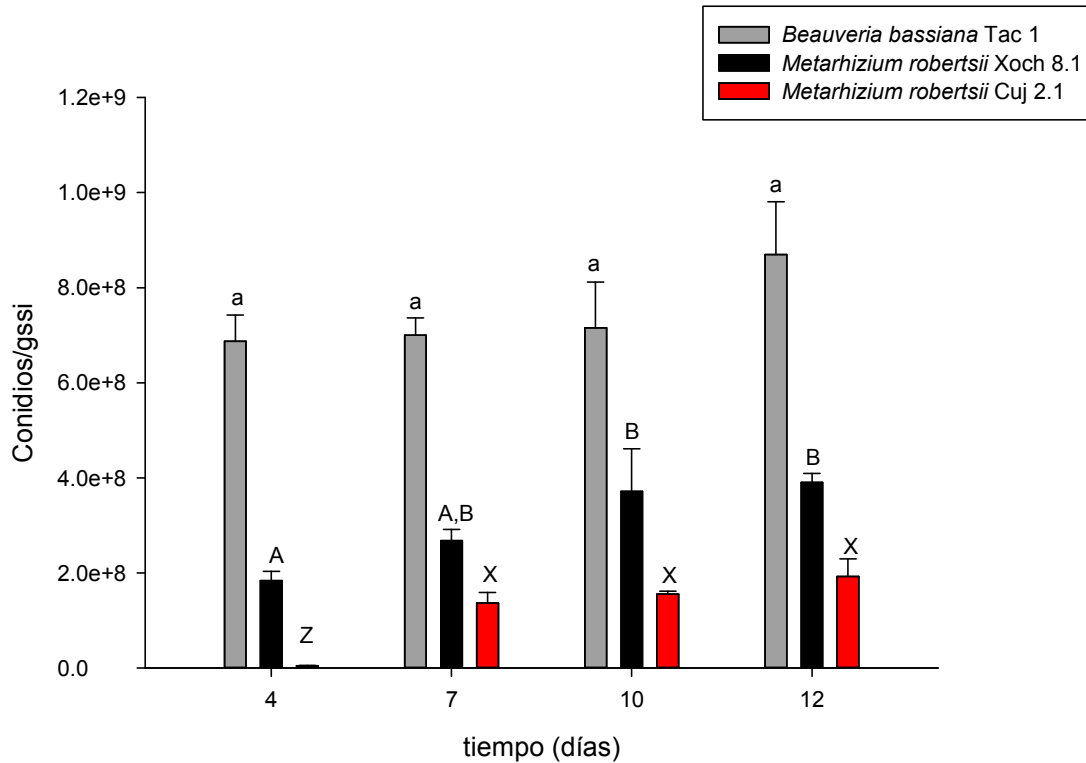


Figura 10. Segunda Cinética de producción de conidios y análisis de varianza para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 y para *Beauveria bassiana* Tac-1, en el análisis de varianza con ($\alpha=0.05$) se encontró un grupo para *Beauveria bassiana* Tac-1 (a) para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 fueron (A y B) y para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 fueron (Z y X).

8.5 Efecto del cultivo bifásico

8.5.1 Análisis del efecto del cultivo bifásico en la producción de conidios

Para este análisis, se comparó la producción de conidios del cultivo bifásico con los cultivos inoculados con sólo esporas, en el día de máxima producción. Esta comparación se realizó con la finalidad de corroborar si el cultivo bifásico realmente disminuye los tiempos de producción y aumenta la producción de esporas para los hongos entomopatógenos utilizados en este trabajo, para lo cual se usó el medio descrito en la sección 6.2.2 de materiales y métodos para el cultivo bifásico, mientras que para el tratamiento con sólo esporas se utilizaron las esporas extraídas con Tween 80 al 0.05%.

Beauveria bassiana Tac 1

En la **Figura 11**, se muestra los resultados obtenidos de la cinética comparativa de producción de conidios entre el cultivo bifásico y los inoculados con sólo esporas, en los días 4, 7, 10 y 12. En el cuarto día tenemos un crecimiento de dos órdenes de magnitud en la producción de esporas en comparación con el inoculo inicial tanto para el cultivo inoculado con sólo esporas como para el cultivo bifásico, El tratamiento inoculado sólo con esporas presenta una germinación de 18 horas o menos (Garcia *et al.*, 2008) mientras que el cultivo bifásico inicia con esporas ya germinadas permitiéndole empezar a crecer mucho antes ya que la fase lag inició en el cultivo bifásico (Jaronski y Jackson, 2012), y a las 96 horas la cepa de *Beauveria bassiana* se encuentra en proceso de esporulación (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010) en tanto el cultivo bifásico tiene como ventaja el tiempo de germinación. En el día 7 se obtuvo la máxima producción de conidios para el tratamiento del cultivo bifásico, cuya media estimada fue de 2.76×10^9 conidios/gssi, el cual mostró diferencias significativas para *Beauveria bassiana* ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Además, el cultivo bifásico presentó una producción 1.4 veces mayor que la obtenida usando directamente esporas para inocular. En el estudio de Grimm (2001) reportó una producción de 5×10^9 conidios/gssi en 14 días, equivalente a una productividad de 3.57×10^8 conidios/gssi*Día, comparable con nuestra productividad a los 7 días (3.95×10^8 conidios/gssi*Día). Es decir, el uso del cultivo bifásico para *B. bassiana* acorta los tiempos a la mitad en comparación con el cultivo inoculado sólo con esporas y además presenta mejores rendimiento, aunque este aumento en la conidiación se podría atribuir a los nutrientes proporcionados por el cultivo líquido (Petlamul y Prasertsan, 2014; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009) ó a la formación de blastosporas ocasionando que el inoculo inicial sea mayor (Mascarin y Jaronski, 2016) o ambos factores contribuyeron al aumento de la producción de esporas y a la disminución de los tiempos de producción.

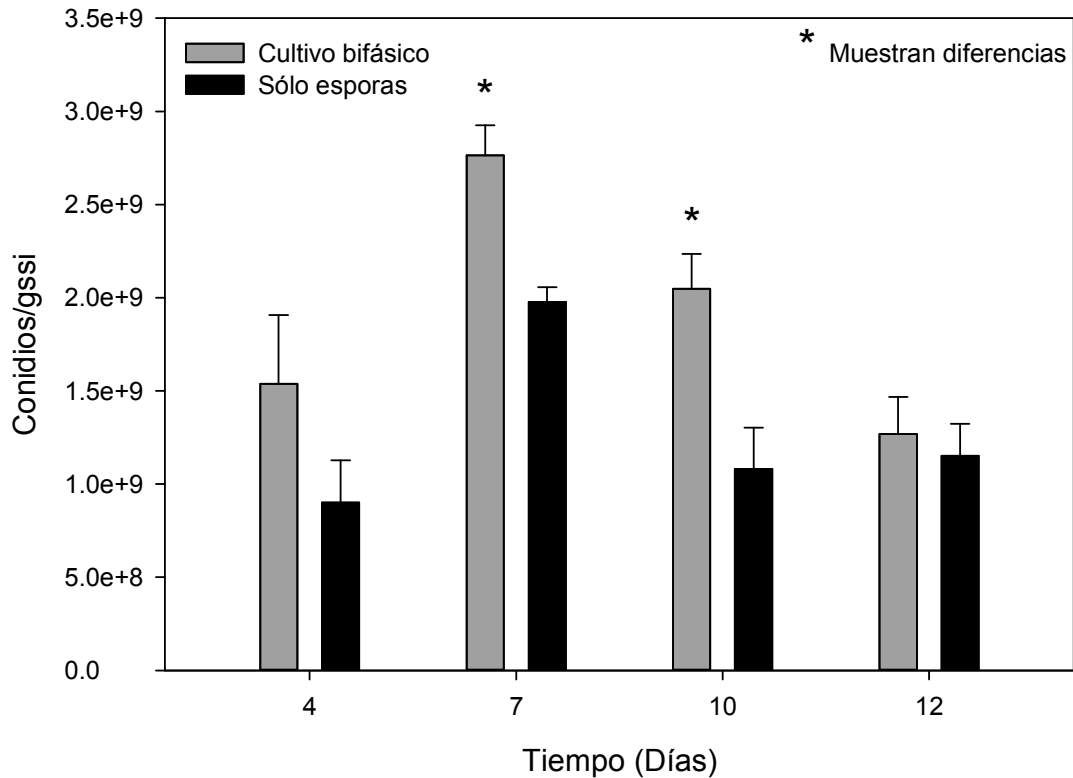


Figura 11. Cinética de producción comparativa de *B. bassiana* Tac 1 entre el cultivo bifásico y sólo esporas.

Metarhizium robertsii Xoch 8.1

Como se puede apreciar en la **Figura 12** para la producción de esporas no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$), por lo que es indistinto usar el cultivo bifásico o sólo esporas. Aunque al usar el cultivo bifásico no se encontró una disminución en la tendencia que presenta la producción de conidios, cabe señalar que el cultivo bifásico no fue capaz de disminuir los tiempos de conidiación, se puede observar que en el día 4 para el cultivo bifásico presenta una conidiación menor respecto al tratamiento solamente con esporas aunque en el séptimo día el cultivo bifásico alcanza los niveles de conidiación de tratamiento con sólo esporas también se puede ver que el tratamiento donde se usaron sólo esporas presenta una fase estacionaria desde el día 7 hasta el día 12 mientras que en el cultivo bifásico aún no se observa un comportamiento estacionario, este efecto se podría atribuir a lo siguiente: A que los conidios de la cepa *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 presentaron una germinación más lenta debido a esto la fase lag se extiende demasiado (Faria *et al.*, 2015;

Jaronski y Jackson, 2012) o a un proceso de adaptación en el cultivo en medio sólido (D'Enfert, 1997).

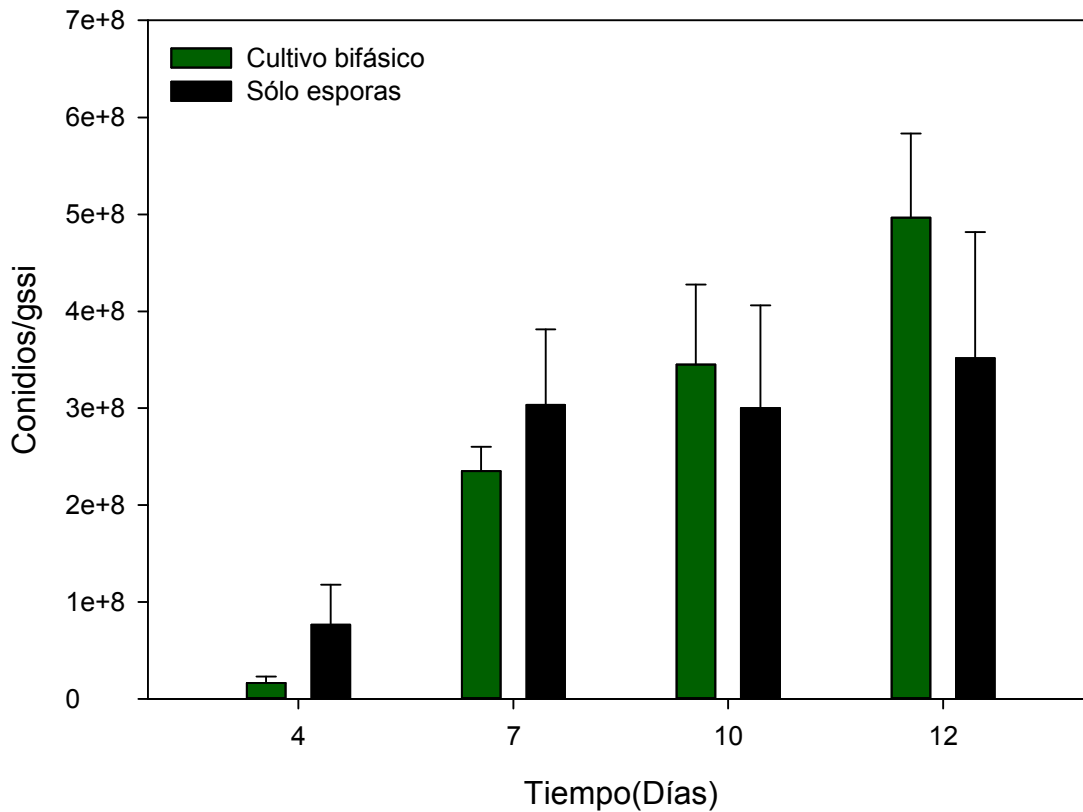


Figura 12. Cinética de producción comparativa de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 inoculados usando el cultivo bifásico y sólo esporas.

Metarhizium robertsii Cuj 2.1

Como se observa en la **Figura 13**, para la producción de esporas no se presentaron diferencias significativas con ($p>0.05$) para el tiempo de máxima producción (10 días), únicamente se observaron diferencias entre los tratamientos en el día 7. Cabe mencionar que *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1, usando el cultivo bifásico, tiene el día 7 como el día de máxima producción ($4.63 \times 10^8 \pm 5.05 \times 10^7$) conidios/gssi, ya que no presentó diferencias significativas con el día 10 ($p>0.05$), además que en el día 7 presentó diferencias significativas entre el tipo de tratamiento (cultivo bifásico vs sólo esporas), siendo la conidiación 1.8 veces mayor con el cultivo bifásico.

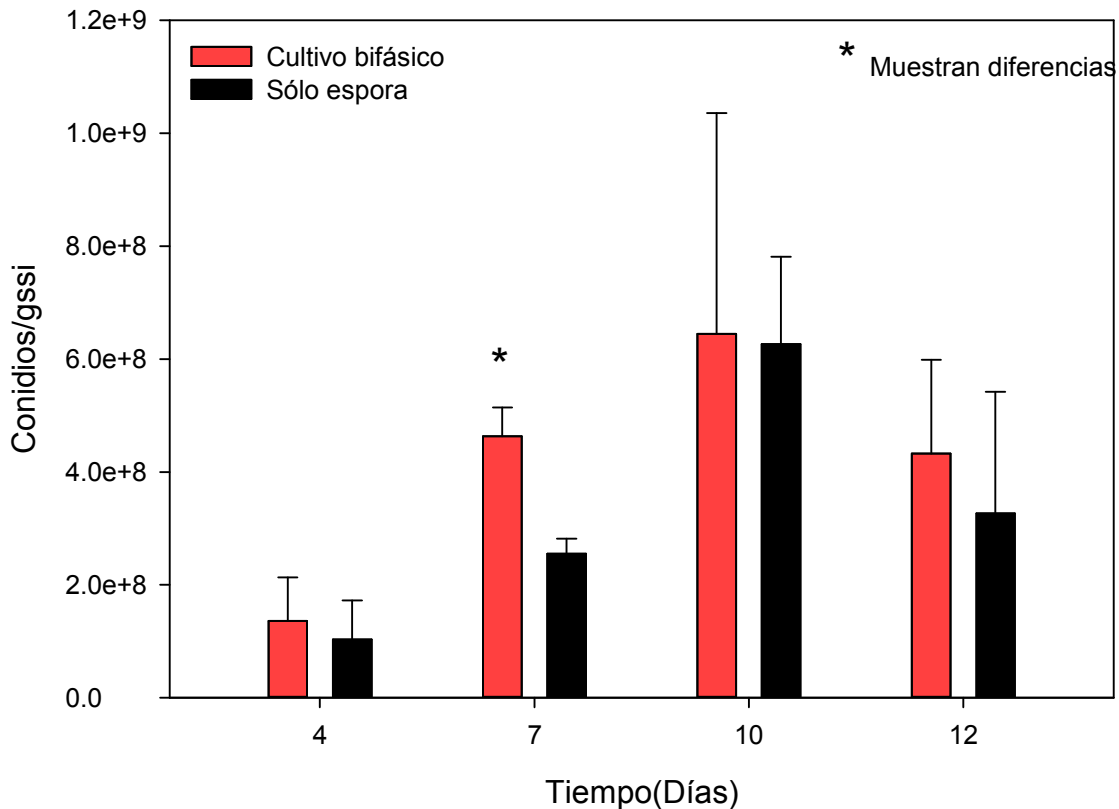


Figura 13. Cinética de producción comparativa de *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 entre el cultivo bifásico y sólo esporas.

Tanto para *Beauveria bassiana* Tac 1 como para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 presentan un punto máximo de conidiación y posteriormente presentan una tendencia negativa en la cantidad de conidios, la cual podría atribuirse debido que en los primeros días no se proporcionó el suficiente mezclado del sustrato ocasionando un secado irregular e incluso nuevo crecimiento vegetativo, lo cual trae como resultado una reducción en el rendimiento de esporas (Jaronski y Jackson, 2012).

8.6 Reuso del arroz

Para el reuso del arroz (primer y segundo reuso) se usaron diversas proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reutilizado (Ar) siendo estas: 100% arroz fresco y 0% arroz reutilizado (100:0), 70% arroz fresco y 30% arroz reutilizado (70:30), 30% arroz fresco y 70% arroz reutilizado (30:70) y 100% arroz reutilizado (0:100).

8.6.1 *Beauveria bassiana* TAC 1

En la **Figura 14** se muestran los datos obtenidos de la cinética de producción de conidios usando diferentes proporciones de Af y Ar. Las proporciones mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control (arroz 100% fresco) con media de $9.06 \times 10^8 \pm 1.80 \times 10^7$ conidios/gssi. La **Figura 15** muestra los datos de la cinética de producción de conidios usando proporciones de Af y Ar₂, donde Ar₂ se refiere al arroz reutilizado por segunda vez. Los valores obtenidos para el arroz reutilizado por segunda vez, mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) para cada uno de los valores obtenidos en la proporción Af: Ar₂, siendo la proporción 100:0, el mejor tratamiento para las proporciones Af: Ar₂ del segundo reuso. El comportamiento que presentó el arroz con uno o dos reusos (Ar y Ar₂), fue que conforme más grande es la proporción de Ar, la producción de conidios disminuye, y se acentúa al reutilizar el arroz por segunda vez, es decir, para la cepa *B. bassiana* Tac 1, el reuso del arroz, ya sea Ar o Ar₂, disminuye la producción de conidios.

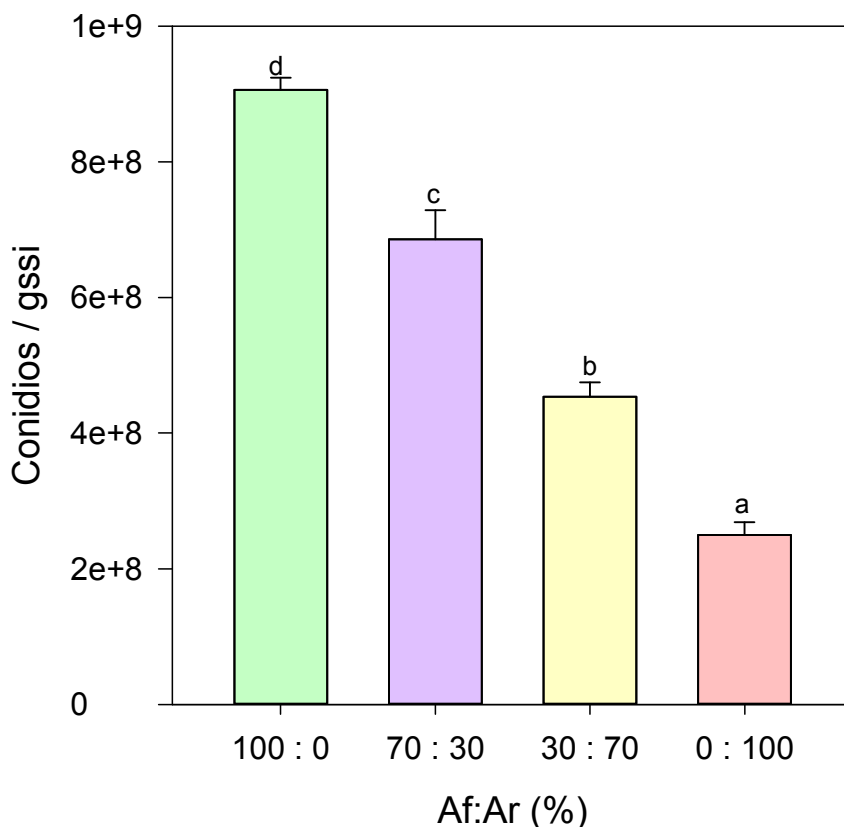


Figura 14. Producción de conidios a los 7 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado (Ar) para *B. bassiana* Tac 1.

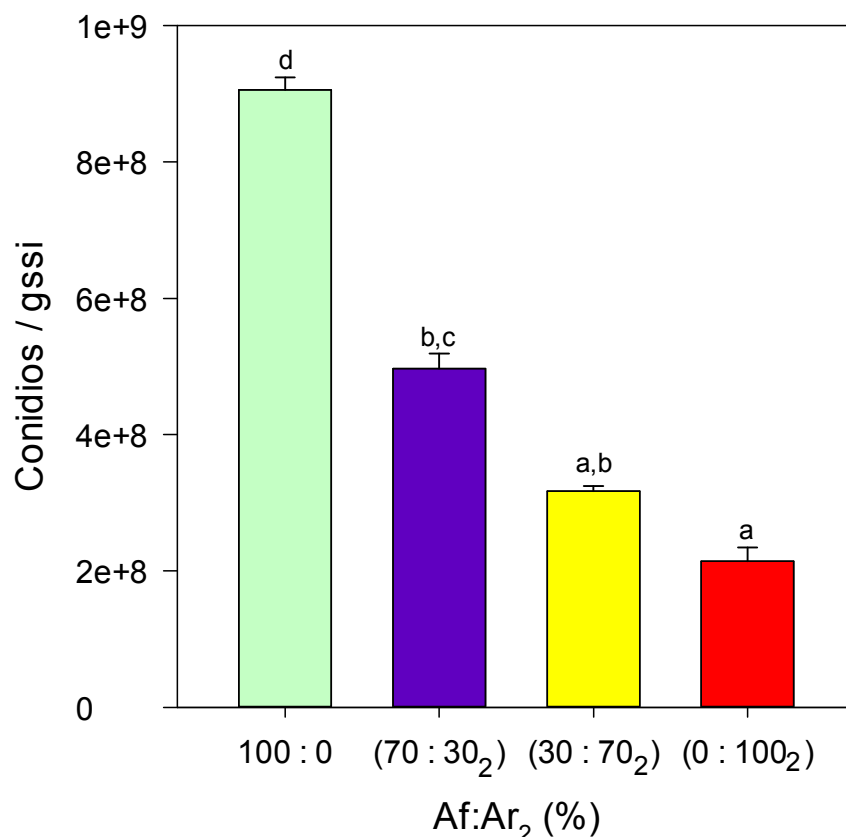


Figura 15. Producción de conidios a los 7 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar₂) para *B. bassiana* Tac 1.

8.6.2 *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1

En la **Figura 16** se observó que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) para los tratamientos de Ar (70:30, 30:70 y 0:100) con medias $1 \times 10^9 \pm 1.13 \times 10^8$, $1.14 \times 10^9 \pm 3.17 \times 10^7$ y $1 \times 10^9 \pm 2.81 \times 10^7$ conidios/gssi, respectivamente, para cada una de las distintas proporciones respecto al control Af:Ar (100:0), cuya media estimada fue $1.03 \times 10^9 \pm 6.63 \times 10^7$ conidios/gssi, por lo que se puede reutilizar el 100% del sustrato sin que la producción de conidios se vea afectada. Por otra parte, en la **Figura 17** se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los tratamientos Ar₂ (70:30, 30:70 y 0:100) con medias $6.73 \times 10^8 \pm 2.1 \times 10^7$, $4.28 \times 10^8 \pm 2.29 \times 10^7$ y $5.3 \times 10^8 \pm 2.27 \times 10^7$ conidios/gssi) con respecto al control (100:0). La producción de conidios se ve disminuye en un 32.7% para 70:30 respecto al control 100:0, según aumenta la proporción de Ar₂ respecto al control, la

producción se afecta cada vez más, mostrando que el segundo reuso afecta negativamente la producción de conidios.

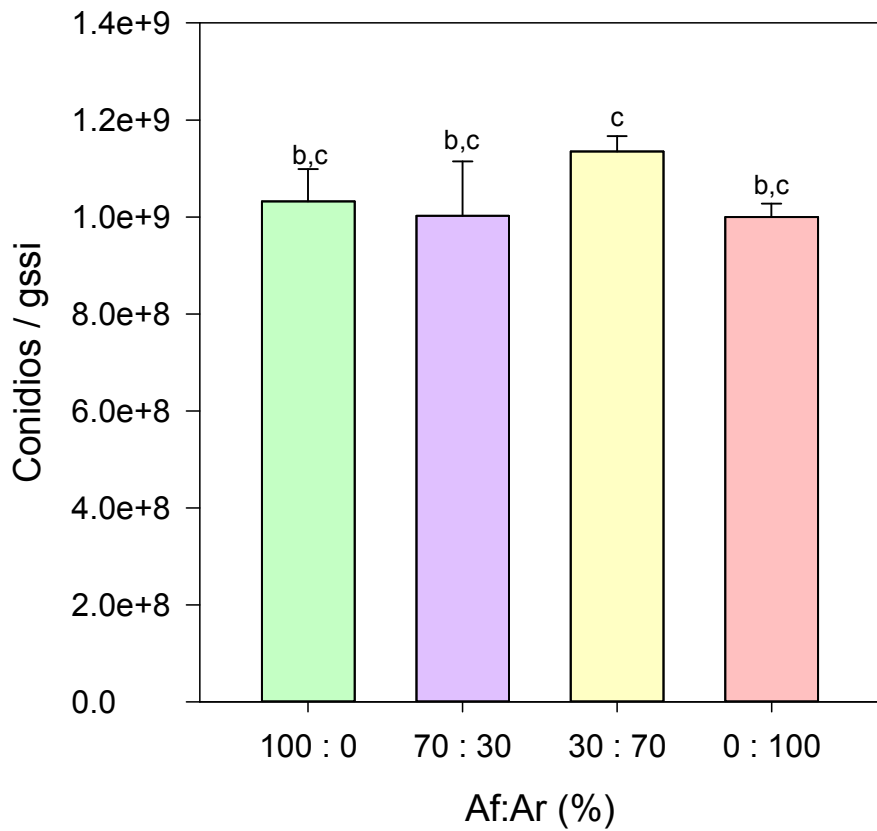


Figura 16. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar) para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1.

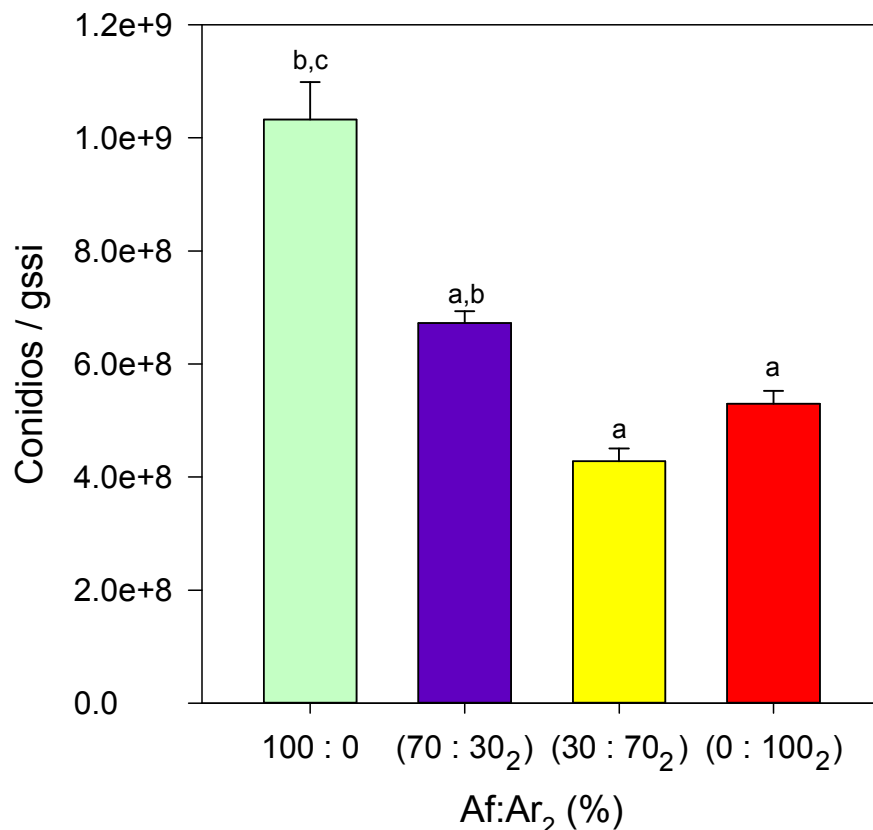


Figura 17. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar₂) para *Metarhizium robertsii* Koch 8.1.

8.6.3 *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1

Para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para todas las proporciones, conforme incrementa la proporción de Ar (70:30, 30:70 y 0:100), cuyas medias estimadas fueron $4.83 \times 10^8 \pm 4.72 \times 10^7$, $7.85 \times 10^8 \pm 2.02 \times 10^7$ y $9.13 \times 10^8 \pm 5.49 \times 10^7$ conidios/gssi respectivamente, la producción de conidios va incrementando en comparación con el control (Af:Ar 100:0), cuya media estimada fue $4.55 \times 10^8 \pm 1.18 \times 10^7$ como se observa en la **Figura 18**. La proporción 0:100 mostró un incremento del doble de la producción de conidios con respecto al control (100:0), por lo que resulta atractivo usar esta proporción debido a su efecto en la producción de conidios. En la **Figura 19** se observó el efecto de las proporciones de Ar₂ (70:30, 30:70 y 0:100) cuyas medias estimadas fueron $4.25 \times 10^8 \pm 2.52 \times 10^7$, $5.30 \times 10^8 \pm 2.55 \times 10^7$ y $5.20 \times 10^8 \pm 3.71 \times 10^7$ conidios/gssi, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control (100:0), se observó que al

incrementar la proporción de Ar₂ se presentó un aumento del 16% respecto al control en la producción de conidios en la proporción 30:70.

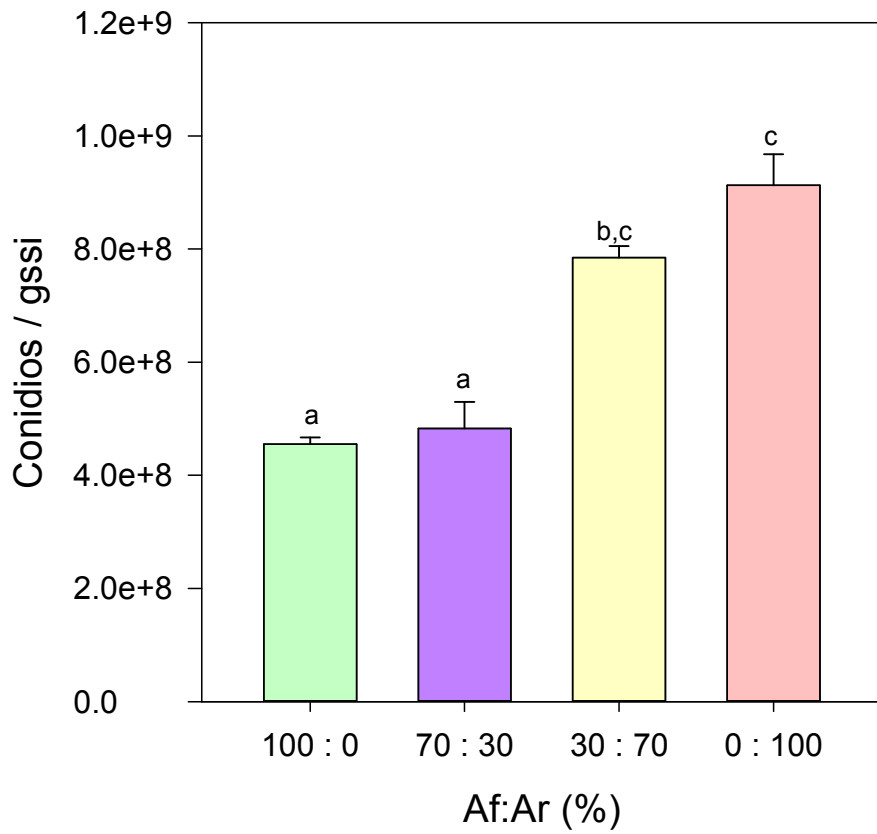


Figura 18. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar) para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1.

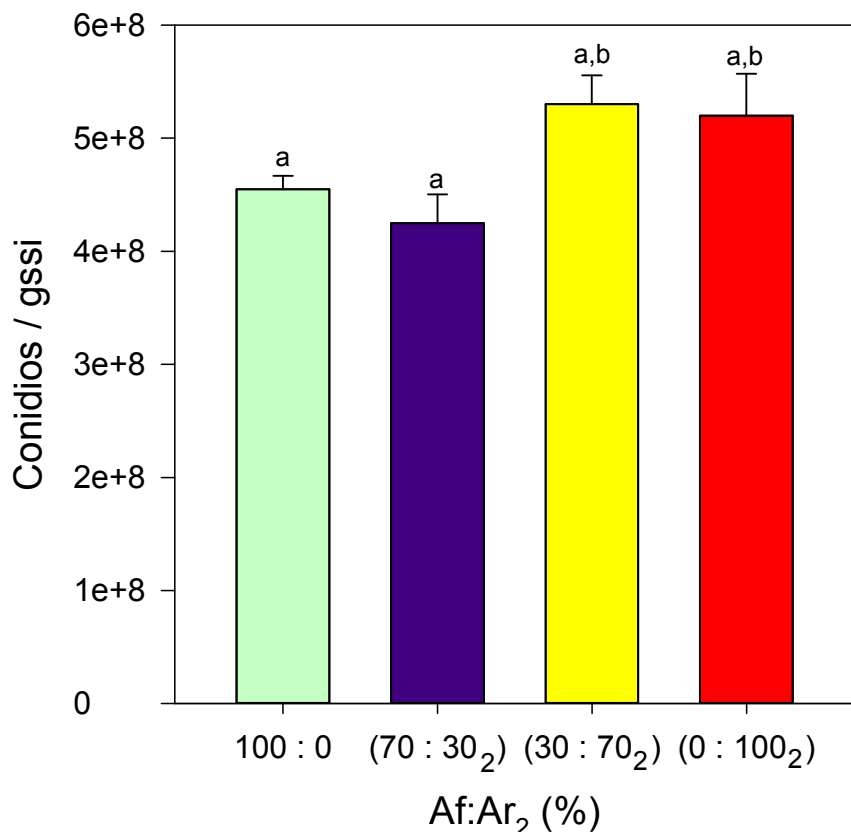


Figura 19. Producción de conidios a los 10 días de cultivo sólido en diferentes proporciones de arroz fresco (Af) y arroz reusado por segunda vez (Ar₂) para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1.

Una de las causas que ocasiona los diversos efectos en cada una de las tres cepas de hongos entomopatógenos se podría atribuir a moléculas de detección de quorum, ya que antes de que las esporas germinen, los conidios realizan un análisis de las condiciones que ofrece el medio ambiente para generar un micelio viable, debido a que las esporas tienen mecanismos sensoriales que les proporciona la información necesaria para que se dé la germinación (D'Enfert, 1997), también existen moléculas que se acumulan durante el crecimiento (Ramage *et al.*, 2009), una de estas moléculas es el farnesol, se ha demostrado que esta molécula de detección del quorum induce la apoptosis fúngica en varios hongos (Wongsuk *et al.*, 2016), se ha reportado para *Aspergillus nidulans* moléculas moduladoras del crecimiento como el bicarbonato, 3-octanona, 3-octanol y el 1-octen-ol y estas tres últimas moléculas también presentan efectos moduladores del crecimiento para *Penicillium paneum*

(Rodríguez-Urra *et al.*, 2009; Chitarra *et al.*, 2004; Herrero-García *et al.*, 2011), algunos autores han reportado moléculas implicadas en el desarrollo asexual de hongos, se reportó la conidiogenona para *Penicillium cyclopium* (Roncal *et al.*, 2002), para *Aspergillus nidulans* reportaron el dehidroaustinol (Rodríguez-Urra *et al.*, 2012), y para *Trichoderma virens* reporta el carot-4-en-9, 10-diol (Wang *et al.*, 2013). Herrero-García *et al.*, (2011) encontraron que la 3-octanona y el 3-octanol podría inhibir la germinación en menor grado y que la viabilidad de las esporas no estaba comprometida ya que la germinación se podría dar tras una dilución de las señales de detección del quorum.

En el primer y segundo reuso para *B. bassiana* se observa una disminución de la conidiación, la cual se podría atribuir a una apoptosis celular como la generada por el farnesol ó que el desarrollo asexual no fue el adecuado. Esta tendencia se repite en el segundo reuso para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 aunque en el primer reuso no se ve este efecto, el cual podría deberse a que la molécula responsable no ha llegado a las concentraciones de inhibición, aunque el efecto de la relación C/N podría ser un factor a tener en cuenta, ya que para *Talaromyces flavus* a mayor relación C/N aumentaron los rendimientos de esporas (Engelkes *et al.*, 1997) y otros estudios mencionan que para inducir la esporulación es necesario que la fuente de carbono se encuentre en abundancia y el contenido de nitrógeno sea el factor limitante (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2018). Tanto *B. bassiana* Tac 1 y *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 presentan un efecto negativo en el segundo reuso cuando se incrementa la fracción de arroz reutilizado, pero este efecto no se observa en *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 ya que en el primer reuso conforme la proporción de arroz reutilizado se incrementa se observa un incremento en la producción de esporas lo cual se podría atribuir a una molécula que favorezca la producción de esporas (Affeldt *et al.*, 2012) mientras que en el segundo reuso al incrementar la proporción de arroz reusado por segunda vez el rendimiento de conidios no se ve afectado.

En cuanto a los niveles de conidiación para *B. bassiana* en la proporción 100:0, están por debajo de los niveles reportados por Ye *et al.*, (2006), con rendimientos de 2.7×10^9 conidios/gssi, mientras que los rendimientos en *M. anisopliae* que reporta Barajas *et al.*, (2010) son de 1×10^9 conidios por gramo de arroz, siendo comparable únicamente con la

producción de esporas de *M. robertssi* Xoch 8.1, cuya media estimada fue de 1×10^9 conidios/gssi únicamente para cualquier proporción del primer reuso.

8.7 Relación C/N

En la **Figura 20** se muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) en las relaciones C/N de Af con media 20.84 ± 1.03 , contra Ar para cada cepa (Xoch, Cuj y Tac 1) con media 28.77 ± 0.69 , 27.02 ± 1.24 y 26.22 ± 1.19 respectivamente. Las tres cepas aumentaron 1.31 veces la relación C/N después de crecer en el sustrato, debido al consumo de nitrógeno cuando se ocupa Ar como sustrato. Debido a este aumento en la relación C/N la producción de conidios podría afectarse, Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) reportó una C/N de 35, con la cual obtuvo mejores rendimientos de conidios, aunque algunos autores reporta que la relación C/N afecta de manera diferente los rendimientos de los conidios dependiendo de la cepa (Shah, Wang, y Butt, 2005).

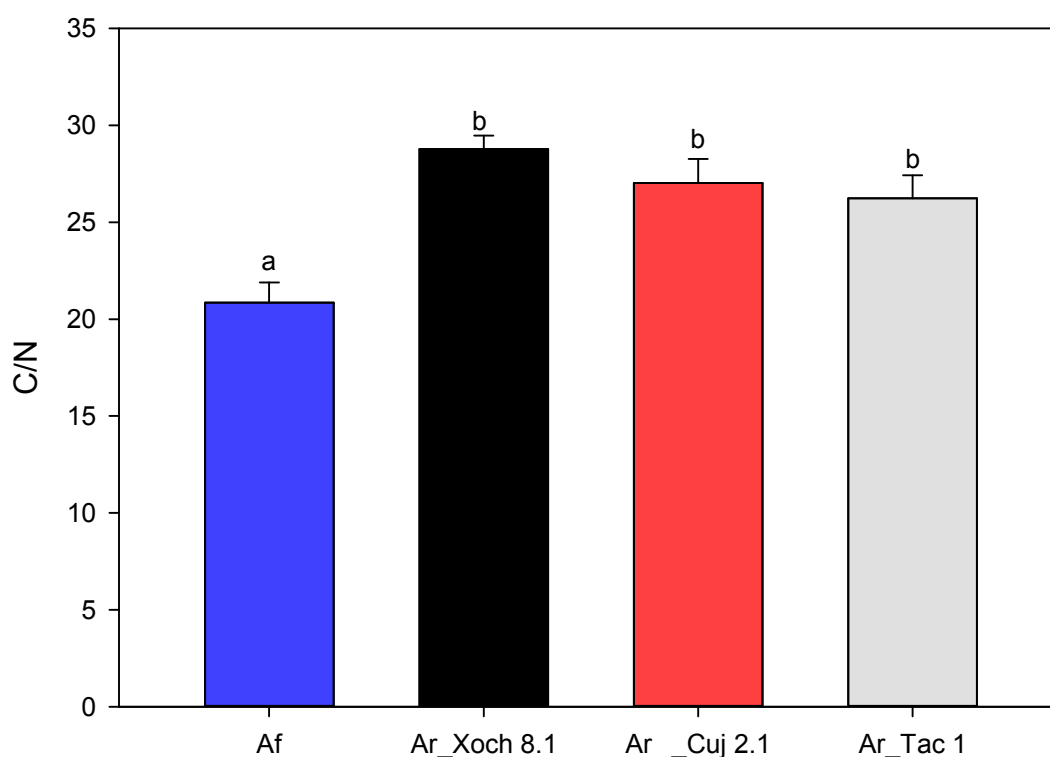


Figura 20. Análisis comparativo de relaciones C/N para arroz fresco (Af) y arroz reutilizado (Ar) (100% reusado para cada cepa).

8.8 Porosidad

En estudios recientes se observó que la porosidad es un parámetro que debe considerarse, ya que a partir de este parámetro es posible incrementar la producción de conidios, y que este parámetro no afecta la calidad ni la infectividad de los conidios (Angel-Cuapio *et al.*, 2015). En la **Figura 21** se puede observar que la porosidad del control no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) respecto a *Beauveria bassiana* Tac 1 tanto para el primer como para el segundo reuso del sustrato, mientras que para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.2 únicamente se mostraron diferencias significativas ($p<0.05$) para el segundo reuso, y para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 se observaron diferencia significativa ($p<0.05$) en el segundo reuso del sustrato. Podemos observar que en algunos casos, el efecto del incremento de la producción de conidios en el primer reuso, no se puede atribuir al efecto de la porosidad, ya que esta no se ve modificada, mientras que para el segundo reuso no está muy claro si la porosidad podría ser el factor clave de la disminución de la producción de conidios para cada una de las cepas, podría no ser el factor clave, pero influye de manera negativa ya que la porosidad disminuye para el segundo reuso, lo que nos quiere decir que el arroz se está compactando, la disminución de la porosidad del sustrato genera que el área superficial de cultivo disminuya drásticamente, también afecta la transferencia de oxígeno lo cual disminuye en la producción de esporas (Raimbault, 1998).

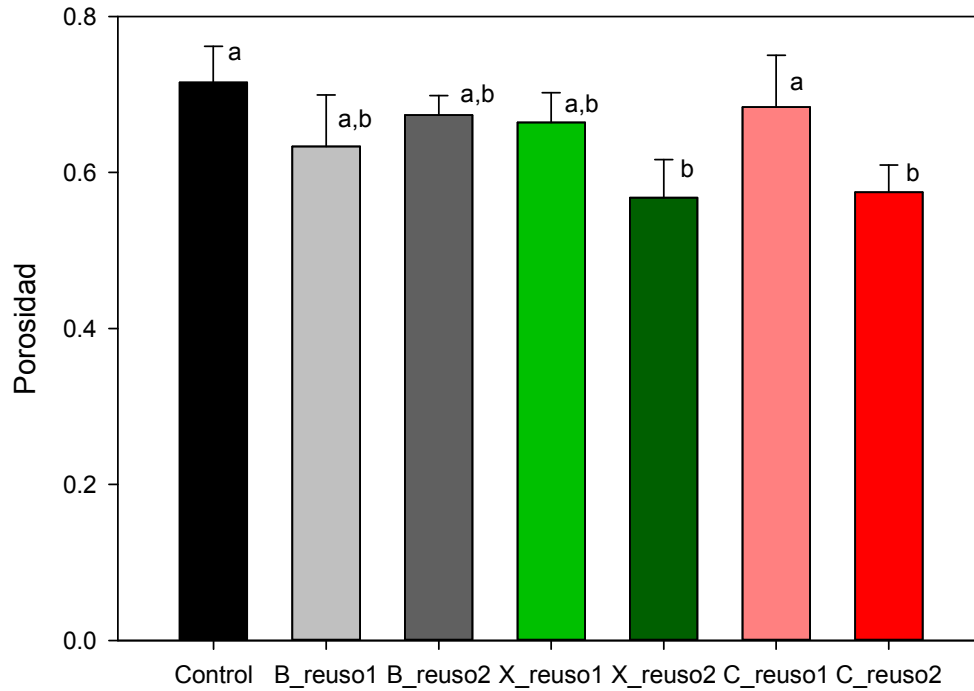


Figura 21. Estimación de la porosidad para los sustratos reutilizados de cada una de las cepas.

8.9 Pruebas de calidad

En la **Figura 22** se muestran los datos de viabilidad de conidios, obtenidos para cada proporción de arroz de la cinética de producción de conidios, para las cuales se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los conidios de *B. bassiana* en las diversas proporciones de Af:Ar.

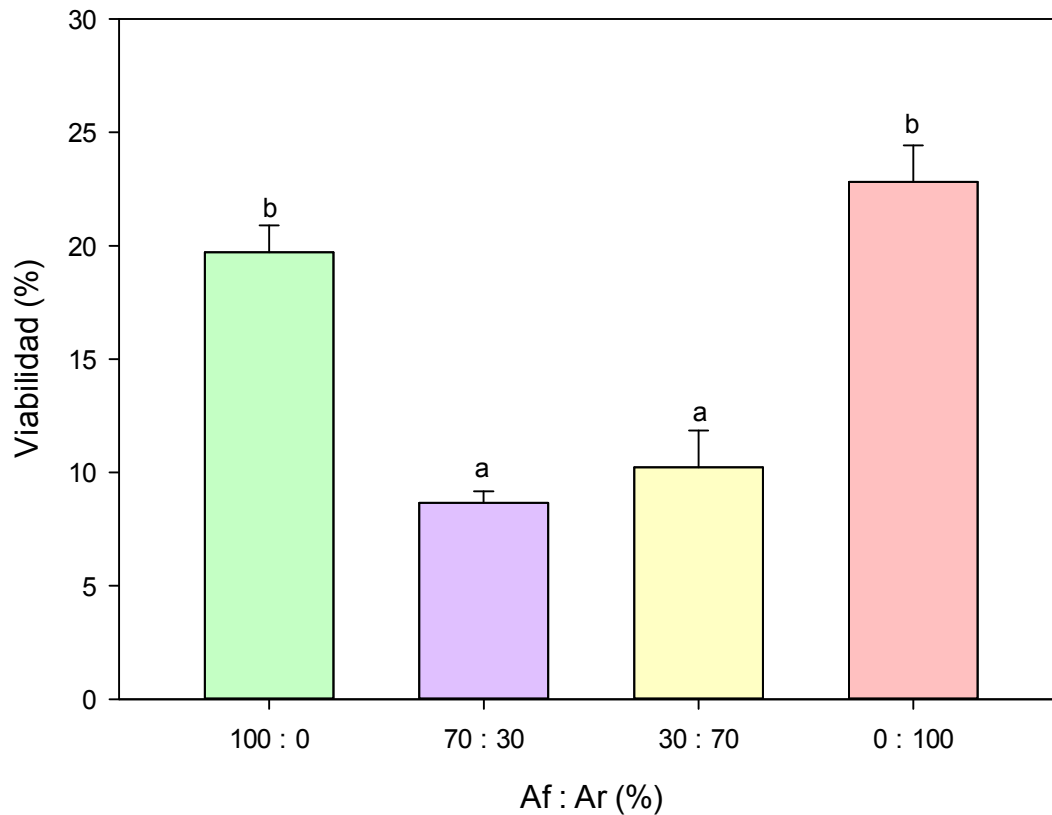


Figura 22. Prueba de viabilidad a los 7 días de cultivo sólido de *Beauveria bassiana* Tac 1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.

En la **Figura 22** la calidad de los conidios de *B. bassiana* Tac 1 presentan una disminución drástica de la viabilidad ya que disminuye el doble de la viabilidad inicial, este efecto se observa al usar las proporciones 70:30 y 30:70, mientras que al usar la proporción 100:0 de arroz reusado (Af:Ar) la viabilidad no se ve afectada.

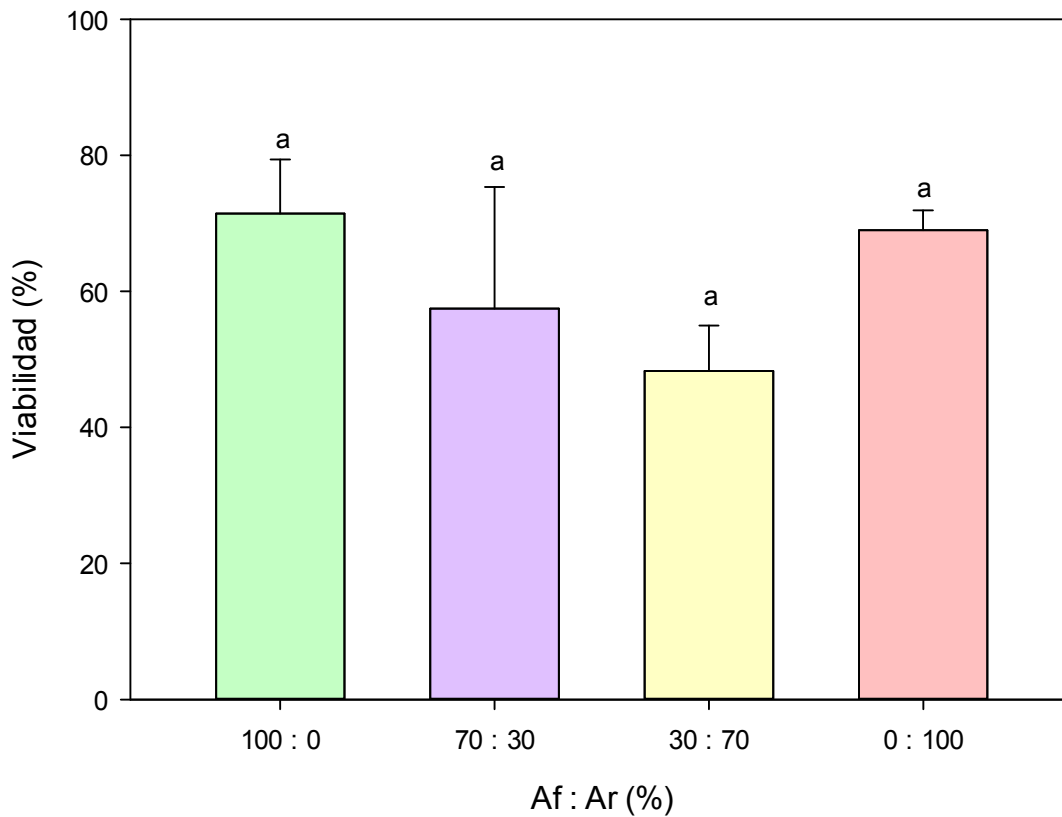


Figura 23. Prueba de viabilidad a los 10 días de cultivo sólido de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.

La calidad evaluada en *M. robertsii* Xoch 8.1 (**Figura 23**) no se vio afectada en las distintas proporciones de arroz reutilizado, además la producción de conidios en el primer reuso se mantuvo para todas lo valores de Af:Ar en comparación con la proporción 100:0, por lo cual la proporción donde se presenta solamente arroz reutilizado (0:100) resulta ser atractivo ya que se podría utilizar el 100% del sustrato residual sin que la viabilidad de los conidios se vea comprometida.

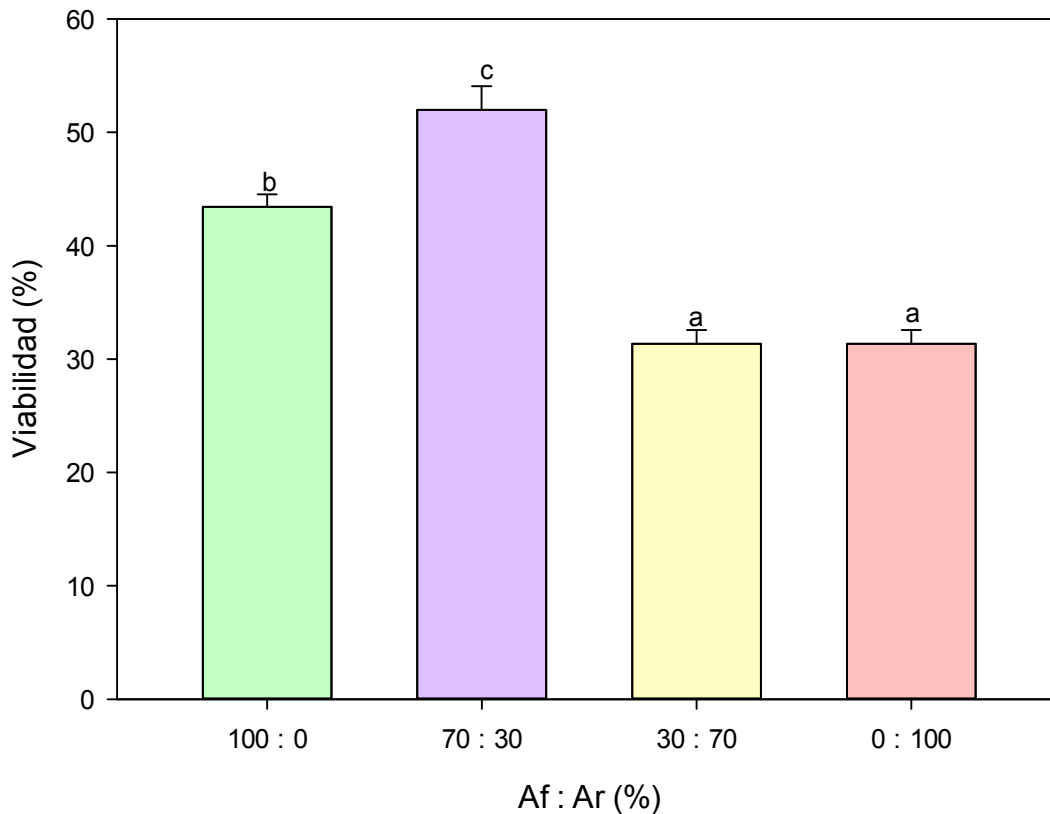


Figura 24. Prueba de viabilidad a los 10 días de cultivo sólido de *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 en cada uno de los tratamientos de reuso de arroz.

El reutilizar el sustrato una sola vez tiene efectos negativos en la viabilidad conforme la proporción de arroz reutilizado aumenta en específico para las proporciones 30:70 y 0:100 (Af:Ar) (**Figura 24**), cabe resaltar que la viabilidad de las esporas aumentó con respecto al 100% de arroz fresco en la proporción 70:30 (Af:Ar), además los niveles de conidiación en las proporciones 100:0 y 70:30 no presentan diferencias significativas, por lo que al reutilizar el 30% además de tener un efecto en la disminución de costos de producción se presentan mejoras en la calidad de los conidios.

La viabilidad de los conidios se vio afectada negativamente tanto para *Beauveria bassiana* Tac 1 como para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1, una de las causas que propicia la disminución

de la viabilidad puede ser por la presencia de una molécula de detección del quorum como el farnesol, que al encontrarse presente desencadena una disminución en la viabilidad de los conidios (Wongsuk *et al.*, 2016), aunque en algunos casos la viabilidad no se vio alterada con forme la fracción de arroz reusado fue aumentando en los casos de *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1, para lo cual las concentraciones de moléculas de detección de quorum aun no llegan a las concentraciones que puedan afectar la viabilidad de las esporas (Ramage *et al.*, 2009). En los casos en los cuales la viabilidad de las esporas sufre un aumento en comparación con la proporción de arroz fresco la relación C/N podría estar minimizando el efecto que ocasiona las moléculas de detección del quorum ya que a valores altos de C/N se incrementa los rendimientos de conidios para *Talaromyces flavus* (Engelkes *et al.*, 1997). La cepa de *B. bassiana* presenta un valor máximo de viabilidad del 20% en las relaciones 100:0 y 0:100 (Af:Ar), siendo mucho menor que lo reportado por Nuñez-Gaona *et al.*, (2010) quienes reportan una viabilidad del 70%. En el caso de *M. robertsii* Xoch 8.1 y Cuj 2.1 el rango de viabilidad fue entre 40-70% y 30-50%, respectivamente, mientras Loera-Corral *et al.*, (2016) reportan un valor de viabilidad del 75% en *Metarhizium anisopliae*, siendo la cepa *M. robertsii* Xoch 8.1 en las proporciones 100:0 y 70:30 las únicas que presentan una viabilidad similar a lo reportado. Esta bajas viabilidades podrían deberse a una alta coalescencia entre las esporas, debido a cargar electrostáticas que presentan los conidios (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010).

8.10 Infectividad

En la **Tabla 6** se muestran los parámetros del modelo de infectividad propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.*, (2009) para cada una de las cepas, se puede observar que la cepa que tiene el menor tiempo, en el cual se muere el 50% de las larvas (LT_{50}) fue *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1, para cada una de las proporciones Af:Ar, mientras que la cepa con mayor LT_{50} fue *Beauveria bassiana* Tac 1.

Los resultados obtenidos para *B. bassiana* muestran valores de LT_{50} elevados a excepción de los valores obtenidos en la proporción 0:100 (Af:Ar), evidenciando una mayor infectividad que en cualquiera de las diferentes proporciones Af:Ar, en donde el tiempo letal cincuenta estimado fue de 5.26 días, siendo comparable con los 5.58 días que reporta Luo *et al.*, (2017).

Las cepas de *M. robertsii* presentan diferencias en cuanto al tiempo letal 50, de hecho la cepa que presenta el menor tiempo letal cincuenta fue la cepa de *M. robertsii* Cuj 2.1 con media estimada de 3.08 ± 0.82 en la proporción 100:0, la cual no presentó diferencias significativas entre las diversas proporciones de Af:Ar. Los valores de infectividad obtenidos fueron superiores, en comparación con Tlecuítl-Beristain et al., (2010), cuyo LT_{50} fue de 4.31 ± 0.11 , mientras que los valores de infectividad obtenidos para *M. robertsii* Xoch 8.1 no presentaron diferencias significativas entre las diversas proporciones de Af:Ar con respecto a la relación 100% de arroz fresco, con media estimada 8.47 ± 1.47 , esto pone en evidencia que la infectividad varía dependiendo de las cepas.

Tabla 6 Parámetros de infectividad de los conidios de *Beauveria bassiana* Tac 1, *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 y *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 con *G. mellonella* con huésped.

Cepa	Af:Ar	t ₀ (días)	LT ₅₀ (días)	K (días ⁻¹)
<i>Beauveria bassiana</i> Tac 1	100:0	2.05 ± 0.1 ^g	14.10 ± 2.31 ^h	0.06 ± 0.01 ^k
	70:30	1.58 ± 1.79 ^g	29.31 ± 8.83 ^{h,i}	0.03 ± 0 ^k
	30:70	1.61 ± 1.37 ^g	24.63 ± 8.38 ^j	0.04 ± 0.01 ^k
	0:100	2.73 ± 1.09 ^g	5.26 ± 1.47 ^{ij}	0.59 ± 0.61 ^k
<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch 8.1	100:0	3.33 ± 1.54 ^d	8.47 ± 1.47 ^e	0.19 ± 0.15 ^f
	70:30	3.96 ± 0.94 ^d	12.03 ± 2.52 ^e	0.09 ± 0.03 ^f
	30:70	2.32 ± 0.46 ^d	8.69 ± 0.43 ^e	0.11 ± 0.01 ^f
	0:100	2.771 ± 0.203 ^d	14.05 ± 9.68 ^e	0.09 ± 0.05 ^f
<i>Metarhizium robertsii</i> Cuj 2.1	100:0	2.33 ± 0.61 ^a	3.08 ± 0.82 ^b	0.98 ± 0.25 ^c
	70:30	2.24 ± 0.75 ^a	3.72 ± 0.20 ^b	0.52 ± 0.21 ^c
	30:70	3.42 ± 2.06 ^a	4.82 ± 1.32 ^b	0.64 ± 0.37 ^c
	0:100	2.94 ± 0.01 ^a	3.78 ± 0.16 ^b	0.85 ± 0.15 ^c

9. Resumen de resultados

1. En el caso de *B. bassiana* Tac 1 el uso de arroz reutilizado Ar y Ar₂ afectó de forma negativa y proporcional la producción de conidios respecto al control, siendo más notable este efecto al utilizar arroz del segundo reuso.
2. Para la cepa *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 el reuso de arroz no afectó la producción de conidios, incluso es posible utilizar 100% de arroz reusado sin mostrar diferencias respecto al control, de forma similar a la cepa anterior el doble reuso de arroz afecta negativamente la producción de conidios respecto al control.
3. La cepa *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 resulta la opción más atractiva a nivel industrial, ya que incrementa la producción de conidios respecto al control al utilizar arroz del primer reuso, cuando se utilizan proporciones de arroz reusado >30. La diferencia de las cepas anteriores es capaz de mantener la producción de conidios al reutilizar arroz de doble reuso.

10. Conclusión

La liofilización no puede ser considerada un método muy extremo para conservar las cepas de hongos entomopatógenos debido a los datos obtenidos y por el error de la implementación en la metodología. El uso del cultivo bifásico disminuye los tiempos de producción de esporas y aumenta los rendimientos de conidios tanto para *Beauveria bassiana* Tac 1 que en el séptimo día presenta el punto de máxima conidiación, al igual para *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 que presenta el séptimo día el punto máximo de conidiación, mientras que para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 no se encontraron diferencias entre el cultivo bifásico y sólo esporas. Al reutilizar el sustrato una vez y al incrementar la proporción del arroz reutilizado disminuye drásticamente los rendimientos de los conidios por lo que se podría inferir la interferencia de metabolitos secundarios producidos por el hongo, y que permanecerán en el arroz, afectando la viabilidad después del primer reuso, aunque al aumentar la proporción de arroz reutilizado en su totalidad, la viabilidad no se afecta, pero los rendimientos de conidios disminuyen.

Al reusar el sustrato en *Beauveria bassiana* Tac 1 por segunda vez los rendimientos presentan una disminución al igual que en el primer reuso. Para *Metarhizium robertsii* Xoch 8.1 al reutilizar el sustrato una vez e incrementar la proporción de arroz reusado no se presenta efectos negativos en los rendimientos de esporas, ni en la viabilidad de las esporas, mientras que en la producción de conidios del segundo reuso se observa un efecto negativo en la producción de esporas, de hecho conforme aumenta la fracción de arroz reutilizado por segunda vez, por lo que el usar el 100% del arroz reutilizado la primera vez no afectó la producción ni la viabilidad de los conidios además del aporte a disminución de costos en la producción. La cepa de *Metarhizium robertsii* Cuj 2.1 presentó aumentos en la producción de conidios al incrementar la fracción de arroz reutilizado por primera ocasión mientras que la viabilidad también se afectó negativamente pasando de un 40% a un 30% al usar el 100% del arroz reutilizado por primera ocasión, pero si se reutiliza el arroz por segunda ocasión los rendimientos de los conidios no se ven alterados respecto al usar 100% de arroz fresco, por lo que se puede utilizar el 100% del arroz reutilizado una vez pero con conidios con una calidad menor. También se puede utilizar el 100% del arroz reutilizado por segunda vez manteniendo los niveles de conidiación, pero a expensas de que la viabilidad sea menor. El número de veces de reuso del arroz y la proporción en que se utiliza tiene un efecto particular sobre la producción de conidios, siendo dependiente de la cepa que se utiliza.

Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de determinar el efecto del reuso del sustrato para la producción de conidios a escala industrial de las diferentes cepas de hongos entomopatógenos.

11. Perspectivas

A continuación se mencionan algunas perspectivas que surgen del presente trabajo:

- Observar el efecto combinado del arroz reutilizado entre las tres cepas en la producción de conidios.
- Implementar el cultivo bifásico en el primer y segundo reuso del arroz.
- Verificar la presencia de moléculas inhibidoras del crecimiento o de la conidiación.

12. Bibliografía

1. Affeldt, K. J., Brodhagen, M., & Keller, N. P. (2012). *Aspergillus* oxylipin signaling and quorum sensing pathways depend on G protein-coupled receptors. *Toxins*, 4(9), 695-717.
2. Aluja, M., & Mangan, R. L. (2008). Fruit fly (*Diptera*: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. *Annu. Rev. Entomol.*, 53, 473-502..
3. Angel-Cuapio, R. (2011). Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, México.
4. Angel-Cuapio, A., Figueroa-Montero, A., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Perraud-Gaime, I., & Loera, O. (2015). Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: effect on conidial yields and quality. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(2), 446-457.
5. Barajas, C., E. del Pozo, I. García, y A. Méndez. 2010. Obtención de conidios del aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal* 25(3):174-180
6. Barra-Bucarei, L., Vergara, P., & Cortes, A. (2016). Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(4), 448-454. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392016000400008>
7. Baulcombe, D., Crute, I., Davies, B., Dunwell, J., Gale, M., Jones, J., & Toulmin, C. (2009). Reaping the benefits: science and the sustainable intensification of global agriculture. The Royal Society.
8. Bellon-Maurel, V., Orliac, O., and Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38(6):881-896.
9. Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D. I., & Adams, B. J. (2016). Biological control and nutrition: Food for thought. *Biological control*, 97, 131-138.
10. Bosch, R. v. d. and Messenger, P. B. (1973). An introduction to biological control. Plenum Press.

11. Bukhari, T., Takken, W., & Koenraadt, C. J. M. (2013). Biological tools for control of larval stages of malaria vectors – a review. *Biocontrol Science and Technology*, 23(9), 987–1023. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.810706>
12. Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., & Dijksterhuis, J. (2004). Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2823-2829.
13. d'Enfert, C. (1997). Fungal Spore Germination: Insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and Biology*, 21(2), 163-172.
14. Eilenberg, J. and Hokkanen, H. M. (2006). An ecological and societal approach to biological control, volume 2. Springer.
15. Engelkes, C. A., Nucló, R. L., & Fravel, D. R. (1997). Effect of carbon, nitrogen, and C: N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, 87(5), 500-505.
16. Estefes Chávez, A. (2015). Evaluación de la producción y calidad de hongos entomopatógenos aislados de 5 delegaciones agrícolas del Distrito Federal. Tesis de Especialización en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Distrito Federal, México. 140p.
17. Fang, W., Pava-Ripoll, M., Wang, S., & Leger, R. S. (2009). Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(3), 277-285.
18. Faria, M., Lopes, R. B., Souza, D. A., & Wraight, S. P. (2015). Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.012>
19. Ferguson, L. V., Heinrichs, D. E., & Sinclair, B. J. (2016). Paradoxical acclimation responses in the thermal performance of insect immunity. *Oecologia*, 181(1), 77–85. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3529-6>
20. Gandarilla-Pacheco, F. L., Morales-Ramos, L. H., Pereyra-Alfárez, B., Elías-Santos, M., & Quintero-Zapata, I. (2018). Producción de unidades infectivas de *Isaria fumosorosea* (Hypocreales: Cordycipitaceae) a partir de aislados nativos del noreste de México mediante 3 estrategias de propagación. *Revista Argentina de*

Microbiologia, 50(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.03.008>

21. Garcia, M. V., Monteiro, A. C., Szabó, M. P. J., & Prette, N. (2008). Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 60(4), 855–863. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000400013>
22. García-Ortiz, N., Tlecuitl-Beristain, S., Favela-Torres, E., and Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *metarhizium anisopliae* var. lepidiotum: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6):2783–2791.
23. Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Gomez-Quiroz, L. E., and Loera, O. (2012). Physiological and antioxidant response by *beauveria bassiana* (vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1):353–359.
24. Gibson, D. M., Donzelli, B. G., Krasnoff, S. B., and Keyhani, N. O. (2014). Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. *Natural product reports*, 31(10):1287–1305.
25. Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J. F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M., and Toulmin, C. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *science*, 327(5967):812–818.
26. Gouli, V., Gouli, S., & Kim, J. (2014). Production of *Beauveria bassiana* Air Conidia by Means of Optimization of Biphasic System Technology. *Brazilian Archives of Biology and ...*, 57(August), 571–577. <https://doi.org/10.159/S1516-8913201401745>
27. Grimm, C. (2001). Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in nicaragua. *Crop Protection*, 20(7):623–630.
28. Hajek, A. E. (2004). *Natural enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press.
29. Hernandez-Rosas, F. and Alatorre, R. (2006). Métodos de preservación. Taller: Hongos entomopatógenos: Control de calidad. Manzanillo Colima: Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. 30-36.

30. Herrero-Garcia, E., Garzia, A., Cordobés, S., Espeso, E. A., & Ugalde, U. (2011). 8-Carbon oxylipins inhibit germination and growth, and stimulate aerial conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Biology*, 115(4-5), 393-400.
31. Holder, D. J. and Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (cordyceps) *bassiana* to substrata. *Applied and environmental microbiology*, 71(9):5260–5266.
32. Holder, D. J., Kirkland, B. H., Lewis, M. W., and Keyhani, N. O. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *beauveria* (cordyceps) *bassiana*. *Microbiology*, 153(10):3448–3457.
33. Jaronski, S. T. (2012). Microbial control of invertebrate pests. Beneficial microorganisms in agriculture, food and the environment: safety assessment and regulation. CABI, Wallingford, pages 72–95.
34. Jaronski, S. T., & Jackson, M. a. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 255–284. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00008-7>
35. Jenkins, N. E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. J., Lomer, C. J., *et al.* (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19:21N–32N.
36. Kongtip, P., Nankongnab, N., Mahaboonpeeti, R., Bootsikeaw, S., Batsungnoen, K., Hanchen- laksh, C., Tipayamongkhogul, M., and Woskie, S. (2018). Differences among thai agricultural workers' health, working conditions, and pesticide use by farm type. *Annals of work exposures and health*, 62(2):167–181.
37. Loera-Corral, O., Porcayo-Loza, J., Montesinos-Matias, R., & Favela-Torres, E. (2016). Production of conidia by the fungus *Metarhizium anisopliae* using solid-state fermentation. In *Microbial-Based Biopesticides* (pp. 61-69). Humana Press, New York, NY.
38. López Lastra, C. C., Hajek, A. E., and Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of botany*, 80(10):1126–1130.
39. Lopez-Perez, M., Rodriguez-Gomez, D., & Loera, O. (2015). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives.

Critical Reviews in Biotechnology, 35(3), 334–341.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>

40. Luo, Z., Ren, H., Mousa, J. J., Rangel, D. E. N., Zhang, Y., Bruner, S. D., & Keyhani, N. O. (2017). The PacC transcription factor regulates secondary metabolite production and stress response, but has only minor effects on virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*, 19, 788–802. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13648>
41. Machado, A. C. R., Monteiro, A. C., Almeida, A. M. B. De, & Martins, M. I. E. G. (2010). Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(10), 1157–1163. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001000015>
42. Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
43. Mascarin, G. M., Alves, S. B., and Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *isaria fumosorosea* and *isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4):753–761.
44. Matson, P. A., Parton, W. J., Power, A., and Swift, M. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277(5325):504–509.
45. Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9), 2095–2102. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0672-z>
46. Mostafalou, S. and Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2):157–177.
47. Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Baez, J. R., and Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3):17–29.

48. Nicholls, C. I. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Universidad de Antioquia.
49. Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 771–777. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400004>
50. Petlamul, W., & Prasertsan, P. (2014). Spore production of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* BNBCRC for biocontrol: Response surface optimization of medium using decanter cake from palm oil mill. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(2), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-4175-5>
51. Pham, T. A., Kim, J. J., & Kim, K. (2010). Optimization of Solid-State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. *Mycobiology*, 38(2), 137. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.2.137>
52. Prakash, G. B., Padmaja, V., and Kiran, R. S. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99(6):1530–1537.
53. Prescott, L. M. H., Klein, J. P., Prescott, D. A. L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2004). *Microbiología*. McGraw-Hill,.
54. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.PDF. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 1–15. <https://doi.org/10.2225/vol1-issue3-fulltext-9>
55. Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. (2009). Our current understanding of fungal biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 35(4), 340-355
56. Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (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(3), 513–518. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9917-x>

57. Rodríguez-Gómez, D., Marcial-Quino, J., and Loera, O. (2015). Modulation of conidia production and expression of the gene *bbrgs1* from *beauveria bassiana* by oxygen pulses and light. *Journal of invertebrate pathology*, 130:82–87.
58. Roncal, T., Cordobés, S., Sterner, O., & Ugalde, U. (2002). Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryotic cell*, 1(5), 823-829.
59. Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, *et al.* (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol Lett*, 270, 116–23
60. Scully, L. R., & Bidochka, M. J. (2005). Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(2), 185–189. <https://doi.org/10.1139/w04-124>
61. Shah, F. A., Wang, C. S., & Butt, T. M. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
62. Stanton, R., Morrissey, C., and Clark, R. (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in north america: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 254:244–254.
63. Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., & Arcas, J. A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 481–488. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1901-x>
64. Taylor, P., & Zimmermann, G. (2007). Biocontrol Science and Technology Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, (July 2015). <https://doi.org/10.1080/09583150701593963>
65. Thomas, K., Khachatourians, G., and Ingledew, W. (1987). Production and properties of *beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(1):12–20.
66. Thomas, M. B. and Read, A. F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5(5):377–383.

67. Thomas, M. B., & Read, A. F. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews. Microbiology*, 5(5), 377–383. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1638>
68. Tlecuítl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., & Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *metarhizium anisopliae* var. lepidiotum conidial production and quality. *Mycopathologia*, 169(5), 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
69. Tupe, S. G., Pathan, E. K., & Deshpande, M. V. (2017). Development of *Metarhizium Anisopliae*.
70. Van Breukelen, F. R., Haemers, S., Wijffels, R. H., and Rinzema, A. (2011). Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*, 46(3):751–757.
71. Van Driesche, R., Hoddle, M., and Center, T. (2007). Uso de patógenos de artrópodos como plaguicidas. *Control de plagas y malezas por enemigos Naturales*, pages 443–466.
72. Wang, M., Hashimoto, M., & Hashidoko, Y. (2013). Carot-4-en-9, 10-diol, a conidiation-inducing sesquiterpene diol produced by *Trichoderma virens* PS1-7 upon exposure to chemical stress from highly active iron chelators. *Applied and environmental microbiology*, 79(6), 1906-1914.
73. Wang, Q. and Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17(3):2367–2377.
74. Wongsuk, T., Pumeesat, P., & Luplertlop, N. (2016). Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5), 440–447. <https://doi.org/10.1002/jobm.201500759>
75. Ye, S. D., Ying, S. H., Chen, C., & Feng, M. G. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, 28(11), 799-804.
76. Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 17(9):879–920.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00248

Matrícula: 2143802717

REUSO DEL ARROZ PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 21 del mes de junio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ
DR. OSCAR ARCE CERVANTES
DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ

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

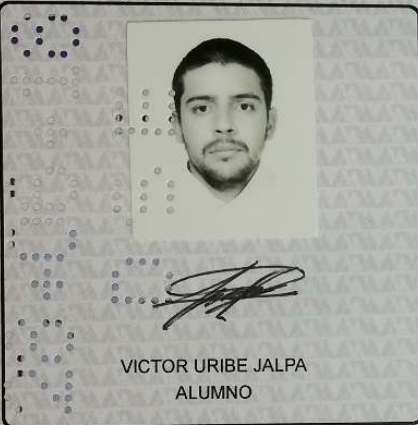
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: VICTOR URIBE JALPA

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


Aprobar

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



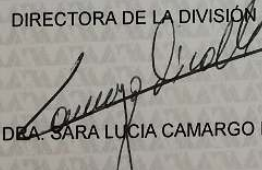
VICTOR URIBE JALPA
ALUMNO

REVISÓ



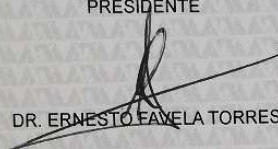
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS




DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



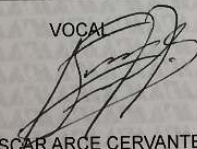
DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL




DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ

VOCAL



DR. OSCAR ARCE CERVANTES

SECRETARIA



DRA. JAZMIN EDITH MENDEZ HERNANDEZ