5. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de la investigación se dividió en dos etapas:

En la primera se realizó la obtención del material biológico compuesto por blastosporas obtenidas a través del empleo de biorreactores de 14 L, en la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UANL, para posteriormente realizar bioensayos de efectividad contra el insecto plaga.

La segunda etapa se realizó en las instalaciones del Campo Experimental la Laguna del INIFAP (CELALA), localizada en el municipio de Matamoros, Coahuila. Donde se encontraba el cultivo de algodón infestado de forma natural por el insecto plaga.

5.1 Conservación y Obtención del material biológico

5.1.1. Origen de la Cepa:

En el presente estudio se utilizó el hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus* clave Pfr-612, aislado de la mosquita blanca (*B. argentifolii*) en Weslaco, Texas, EUA. El microorganismo fue proporcionado de la Colección de Hongos Entomopatógenos del Departamento de Agricultura de los EUA (USDA-ARS), con sede en Peoria, Illinois, USA. Esta cepa se conserva en viales criogénicos conteniendo glicerol al 10 %; para preservar la cepa, se tomaron 100 µL del vial y se sembraron por extensión en agar papa dextrosa (PDA) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 2 semanas. Posteriormente de este cultivo se realizaron cortes de 1 mm^2, se depositaron en glicerol al 10 % y se almacenaron a -80 °C, donde se conservaron hasta que fueron requeridos.

5.1.2. Medios de Cultivo:

Se utilizaron dos medios de cultivo líquido con la misma fuente y concentración de carbono y diferentes fuentes de Nitrógeno. El medio de cultivo basado en casaaminoácidos (Probiotek, San Nicolás de los Garza, N.L. México) y glucosa (Probiotek, San Nicolás de los Garza, N.L. México) patentado y descrito por Jackson *et al.*, 1997.

El otro medio de cultivo utilizado fue desarrollado por Rivas-Morales C., patente en trámite número de registro 9810892 en (1998), el cual contiene peptona de colágeno (Sensient, Jalisco México), extracto de levadura (Sensient, Jalisco México), glucosa (Probiotek, San Nicolás de los Garza, N.L. México).

5.1.3. Preparación del pre-inoculo:

Para obtener una concentración de 5 x 10^5 conidias/mL; se le adicionaron 5.0 mL de agua destilada estéril (para remover las conidias del micelio) a una placa de PDA que contenía la cepa y esta suspensión se transfirió de 3.0 a 5.0 mL al frasco de dilución que contenía agua bidestilada, después se contaron las conidias en un hemocitometro hasta obtener un promedio de 50 conidias entre los cuatro cuadrantes, equivalentes a 5 x 10^5 conidias/mL. Posteriormente se deposito 10 % (v/v) de la suspensión a matraces Erlenmeyer bafleados de 500 mL de capacidad con 100 mL del medio Jackson *et al.*, (1997), pero con 1.5 % de casaaminoácidos totales. Se incubaron en agitación a 300 r.p.m a 28 °C por 72 h.

5.1.4. Preparación de los medios de cultivo:

Para los experimentos se pesaron y se disolvieron por separado todos los componentes de los medios probados. Se les agregó agua biodestilada hasta completar 5 L. Se ajustó el pH a 5.5 en ambos medios con una solución de NaOH 2 N.

Estos medios fueron colocados posteriormente en los vasos de fermentación, los cuales se prepararon y sellaron para su posterior esterilización en una autoclave vertical, a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

5.1.5 Condiciones de Propagación:

Se trabajo a una agitación de 520 r.p.m con una aireación de 1.0 vvm a una temperatura de 28 °C y se controlo el pH a 5.5 durante el proceso de fermentación. El cual fue ajustado con H_3PO4 2N y NaOH 2N. Para el control de la espuma se adiciono el Antiespumante Tipo "A" (Dow Corning Prod., USA) durante la fermentación, además de un cintillo de plástico, colocado en la flecha de agitación el cual sirvió como una barrera física.

5.1.6. Fermentador utilizado:

Marca New Brunswick Scientific Co. Inc. modelo MF-114 de un volumen nominal de 14 litros con un diámetro de tanque (D_t) igual a 0.21 m, con un impulsor tipo Rushton de 6 paletas de 7 cm de diámetro, (1/3 D_t) equipado con un analizador de oxígeno disuelto (O_2D) Ingold modelo 170, analizador y controlador de pH modelo 2300 con electrodos marca Ingold, el volumen de trabajo empleado fue de 5 litros, (h/D_t igual a 0.8 cm).

5.1.7. Inoculación del Fermentador:

Primero, se estabilizaron las condiciones de operación de pH, aireación y temperatura en el modulo de fermentación.

Segundo, del pre-inoculo mencionado anteriormente, se transfirió en condiciones estériles al fermentador de trabajo, con una parte de blastosporas que correspondían a 5 x 10^6 blastosporas/mL, y ajustado según el total de las blastosporas alcanzadas en el pre-inoculo.

5.1.8. Producción de blastosporas en el Fermentador:

Durante la fermentación se monitorio y se tomaron muestras de 5 mL cada 12 horas durante un periodo de tiempo total de 72 h, duración de la fermentación, conservando la esterilidad durante la fermentación, por lo que se utilizo la presencia de flama para la toma de cada muestra, donde se determinaron los siguientes parámetros: cuenta de blastosporas, peso seco y consumo de azúcares. Además de datos imposibles de determinar a nivel matraz, como k_La.

5.1.9. Cuantificación de blastosporas:

De los fermentadores inoculados inicialmente sé tomo una muestra de 5 mL (del caldo de fermentación) de la cual se tomo un 1.0 mL de cada fermentador y se adicionó a 9.0 mL de agua destilada estéril contenida en un tubo de ensaye para posteriormente ser contadas las blastosporas en la cámara de Neubauer, y se observaron a 40x en un microscopio de contraste de fases (Rossbach Modelo LSC-BLH) se tomaron muestras cada 12 h conforme avanzo la cinética en el fermentador, durante toda la fermentación. Los resultados fueron reportados en blastosporas/mL. El diseño experimental se muestra en la Tabla IV.

5.1.10. Determinación de Peso seco:

Se tomo 1.0 mL de las muestras obtenidas, se pasaron a través de una membrana de filtración con una bomba de vacío utilizando papel whatman N° 1, previamente secados y pesados.

La biomasa recuperada se lavó con agua destilada y se seco a 100 °C en una estufa MAPSA Modelo HDP-334 durante 24 horas, posteriormente se calculo el peso, el cual se expreso en gramos/litros. El diseño experimental se muestra en la Tabla IV.

Peso de la muestra = Peso muestra filtrada – Peso papel filtro

$$g / mL = \frac{\text{Peso de la muestra}}{\text{mL de muestra (medio de cultivo)}}$$

$$g / mL = (\text{gramos/mL}) \times 1000$$

5.1.11. Determinación de azúcares:

Las muestras obtenidas anteriormente fueron almacenadas en refrigeración para posteriormente se analizaron las muestras y fueron centrifugadas a 400 r.p.m/5min en el sobrenadante se cuantifico azúcares reductores por el método ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) y se realizaron las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. El diseño experimental se muestra en la Tabla IV.

5.1.12. Recuperación de las blastosporas:

Este paso se realiza al final de la fermentación. Y se utilizo el método de secado por aire y consistió en lo siguiente: el medio de fermentación de cada uno de los diferentes medios de cultivo probados se pasó a través de una malla (Gasa esterilizada) en dos ocasiones, con la finalidad de eliminar el micelio restante. Después el sobrenadante recuperado se mezclo con tierra de diatomeas al 5 % (w/v) y se filtro al vació sobre papel whatman No. 1.

El filtrado se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente controlado a 60% de humedad relativa, se recupero la pasta del filtrado y se pulverizo con ayuda de un mortero. El extracto recuperado fue empacado en bolsas de plástico selladas al vació (Empacadora de vació, Marca Webomatic) y almacenadas a 4 °C. Donde posteriormente se realizó la prueba de viabilidad, y se determinó la sobrevivencia de las blastosporas obtenidas de los dos medios de cultivo probados.

5.1.13. Determinación del porciento de germinación (Viabilidad):

Del extracto recuperado se tomo una pequeña muestra y se le adiciono a 50 mL de caldo extracto de papa contenidos en un matraz bafleado de 250 mL y estuvo en incubación con agitación tangencial a 300 r.p.m durante 6 horas. Al finalizar el periodo de incubación, se realizó un fresco directo del cultivo y se cuentan 100 esporas (germinadas y no germinadas) y se determina el porciento de germinación. El diseño experimental se muestra en la Tabla V.

5.1.14. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La):

Se determinó por el método Dinámico (Taguchi y Humphery, 1966); se denomina dinámico porque se lleva a cabo en sistemas donde se esta efectuando una fermentación. En este método sé grafica la concentración de oxígeno disuelto *vs.* tiempos, la aireación es cortada y la agitación reducida al mínimo en el fermentador durante el proceso, en donde el valor de k_La se vuelve cero (Taguchi y Humphery, 1966; Linek y Sinkule, 1991).

Se realizó cada 24 h y 36 h durante el transcurso de los experimentos. (Ver cálculos y formulas en los apéndices C, D, E, F, G y H)

5.1.15. Formulación de los productos obtenidos:

Del producto recuperado se realizó la separación del producto final en dos partes de blastosporas obtenidas en las fermentaciones. Donde una parte de ambos medios de cultivo se separaron para una preparación en solución líquida (Caldo fermentativo) la cual no contenía ningún soporte para proporcionar sobrevivencia al producto. El resto de las blastosporas obtenidas en los dos medios de cultivo se preparo para dar un producto sólido (polvo), por ello se agrego una cantidad de tierra de diatomeas, proporcional a la cantidad final de blastosporas.

5.1.16. Análisis Estadísticos:

Se determinó la diferencia significativa con el sistema SPSS versión 10, de todas las variables. El criterio para aceptar las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, fue para valores Student's *t*-test, calculados con $p \leq 0.05$. Las variables determinadas de los dos tratamientos fueron analizadas por triplicado, de las muestras tomadas cada 12 h durante del proceso de propagación y son las siguientes: producción de blastosporas, determinación de peso seco, consumo de azúcares y determinación de viabilidad con soporte y viabilidad sin formular.

Tabla IV. Diseño experimental para la determinación de los siguientes parámetros: cuenta de blastosporas, peso seco y consumo de azúcares (A1 medio C. Rivas, A2 medio M. Jackson, R número de repeticiones y B tiempo de muestreo) Diseño factorial (2* 3) con 42 tratamientos.

	A1			A2		
TIEMPO	**R1**	**R2**	**R3**	**R1**	**R2**	**R3**
0	A1B1R1	A1B1R2	A1B1R3	A2B1R1	A2B1R2	A2B1R3
12	A1B2R1	A1B2R2	A1B2R3	A2B2R1	A2B2R2	A2B2R3
24	A1B3R1	A1B3R2	A1B3R3	A2B3R1	A2B3R2	A2B3R3
36	A1B4R1	A1B4R2	A1B4R3	A2B4R1	A2B4R2	A2B4R3
42	A1B5R1	A1B5R2	A1B5R3	A2B5R1	A2B5R2	A2B5R3
60	A1B6R1	A1B6R2	A1B6R3	A2B6R1	A2B6R2	A2B6R3
72	A1B7R1	A1B7R2	A1B7R3	A2B7R1	A2B7R2	A2B7R3

*Tiempo en horas

Tabla V. Diseño experimental para la determinación de los siguientes parámetros: viabilidad con soporte y viabilidad sin formular. (A1 medio C. Rivas, A2 medio M. Jackson, R número de repeticiones y B tiempo de muestreo) Diseño factorial (2* 3) con 54 tratamientos.

	A1			A2		
TIEMPO *	**R1**	**R2**	**R3**	**R1**	**R2**	**R3**
0	A1B1R1	A1B1R2	A1B1R3	A2B1R1	A2B1R2	A2B1R3
7	A1B2R1	A1B2R2	A1B2R3	A2B2R1	A2B2R2	A2B2R3
14	A1B3R1	A1B3R2	A1B3R3	A2B3R1	A2B3R2	A2B3R3
21	A1B4R1	A1B4R2	A1B4R3	A2B4R1	A2B4R2	A2B4R3
28	A1B5R1	A1B5R2	A1B5R3	A2B5R1	A2B5R2	A2B5R3
60	A1B6R1	A1B6R2	A1B6R3	A2B6R1	A2B6R2	A2B6R3
90	A1B7R1	A1B7R2	A1B7R3	A2B7R1	A2B7R2	A2B7R3
120	A1B8R1	A1B8R1	A1B8R1	A1B8R1	A1B8R1	A1B8R1
150	A1B9R1	A1B9R1	A1B9R1	A1B9R1	A1B9R1	A1B9R1

*Tiempo en días

5.2 Evaluación de efectividad en campo

5.2.1. Ubicación del Experimento:

Se llevo a cabo en terrenos del Campo Experimental la Laguna del INIFAP (CELALA), el cual se encuentra localizado en el municipio de Matamoros, Coahuila, en el Km. 17 de la carretera Torreón – Saltillo. La Comarca Lagunera se encuentra ubicada al suroeste del estado de Coahuila y al noroeste del estado de Durango, localizándose entre los meridianos 102 y 104 longitud oeste del meridiano de Greenwich y los paralelos 25° y 27° de latitud norte, tiene además, una altura promedio de 1,120 metros sobre el nivel del mar. El clima de esta región en verano va desde semi-cálido a cálido- seco y en invierno desde semi-frío a frío, mientras que el periodo de lluvias abarca de mediados de junio a mediados de octubre (Santibáñez, 1992).

5.2.2. Manejo Agronómico del Cultivo:

Se utilizo una variedad convencional de algodón (DP 5415), la parcela consto de cuatro surcos separados a 0.76m por 10 de largo (30.4m^2), densidad de nueve plantas / metro lineal. El sistema de riego fue por gravedad. La siembra se realizo el 20 de abril y las aplicaciones se efectuaron a los 150 días después de la siembra del cultivo.

5.2.3. Tratamientos:

Se emplearon tres dosis diferentes (Baja, Media y Alta) (ver Apéndice N), las cuales fueron determinadas basándose en la concentración de conidias/ha que reportaba el testigo biológico comercial, elaborado también con el hongo *P. fumosoroseus*. Estas dosis fueron preparadas con los formulados obtenidos anteriormente en el punto # 5.1.15. (Concentración Líquida y Concentración Sólida). Con respecto a los testigos de este estudio fueron tres los cuales consistían de un testigo biológico formulado con *P. fumosoroseus* (Specifick®) + Rhudo (Ácidos grasos no iónicos) que le sirvió como adherente, otro como testigo químico Endosulfan + Rescate 20 PS (Acetamiprid), muy utilizado para el control de esta plaga y por último un testigo sin tratar (sin aplicación alguna). Por lo tanto se evaluaron un total de siete.

Se realizó una sola aplicación, de los tratamientos y se efectuaron tres muestreos a los 2, 4, y 6 días respectivamente. Las dosis fueron ajustadas a la concentración (1 x 10^{11} esporas/ha) la cual es utilizada en los productos convencionales. Las aplicaciones se efectuaron con un atomizador manual, calibró para efectuar aspersión uniforme a una distancia de 15 cm del envés de la hoja ya seleccionada con anterioridad. La aplicación de los formulados se realizo durante la tarde, con el propósito de proporcionar a los tratamientos con hongos mejores condiciones climáticas.

5.2.4. Diseño Experimental:

Los tratamientos en campo fueron realizados bajo un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones. La unidad experimental fue una hoja de la planta de algodón (*Gossypium hirsutum* L.). Se trataron 10 hojas por tratamiento, por lo tanto se realizaron 10 repeticiones. El diseño experimental se muestra en la Tabla VI.

Tabla VI. Diseño experimental de los tratamientos para el bioensayo a nivel de campo. Diseño factorial (3*3*7) con 63 tratamientos.

Dosis / Tratamiento	Ninfas								
	vivas			infectadas/Muertas			Parasitadas		
	Baja	Media	Alta	Baja	Media	Alta	Baja	Media	Alta
MJ_1	$^t111$	$^t121$	$^t131$	$^t211$	$^t221$	$^t231$	$^t311$	$^t321$	$^t331$
MJ_2	$^t112$	$^t122$	$^t132$	$^t212$	$^t222$	$^t232$	$^t312$	$^t322$	$^t332$
CR_3	$^t113$	$^t123$	$^t133$	$^t213$	$^t223$	$^t233$	$^t313$	$^t323$	$^t333$
CR_4	$^t114$	$^t124$	$^t134$	$^t214$	$^t224$	$^t234$	$^t314$	$^t324$	$^t334$
Specifik®	$^t115$	$^t125$	$^t135$	$^t215$	$^t225$	$^t235$	$^t315$	$^t325$	$^t335$
Endosulfan	$^t116$	$^t126$	$^t136$	$^t216$	$^t226$	$^t236$	$^t316$	$^t326$	$^t336$
Testigo	$^t117$	$^t127$	$^t137$	$^t217$	$^t227$	$^t237$	$^t317$	$^t327$	$^t337$

CR a base de peptona de colágeno (CR_3-polvo, CR_4 liquido)
MJ a base de casaaminoácidos (MJ_1-polvo, MJ_2-líquido)

5.2.5. Variables Evaluadas:

El muestro se realizó de forma manual durante las tardes. El tamaño de muestra que se llevó a cabo fue de 10 hojas por cada planta de algodón para cada tratamiento, tres veces. Las cuales fueron seleccionadas previamente y etiquetadas para los diferentes tratamiento que se emplearon, se seleccionaron las hojas que contenían mayor infestación de *B. argentifolii* en sus diferentes etapas de desarrollo.

Las variables que se evaluaron en este estudio fueron: densidad de ninfas sanas (las que no fueron afectadas por ningún tratamiento durante el periodo de exposición), ninfas parasitadas (ninfas que fueron atacadas por enemigos naturales durante el experimento, caracterizadas por una mancha negra sobre el cuerpo de la ninfa), ninfas infectadas por los tratamiento empleados (caracterizadas por la perdida de vigor, colapsadas, o la presencia de hifas sobre el cuerpo).

5.2.6. Análisis Estadístico:

Se realizaron análisis de varianza para cada variable evaluada (ninfas sanas, ninfas parasitadas, ninfas infectadas por los tratamientos). Cuando se encontró diferencia significativa entre tratamientos, se procedió a realizar las pruebas de rango múltiple de Tukey para la separación de medias de tratamientos. Los valores de porcentajes de ninfas infectadas fueron transformados mediante el arco seno de la raíz cuadrada de la proporción, previamente a los análisis estadísticos, con el propósito de homogenizar las varianzas (Ott, 1988).

6. RESULTADOS

6.1. Producción de *P. fumosoroseus*

6.1.1. Producción de blastosporas a nivel de fermentador:

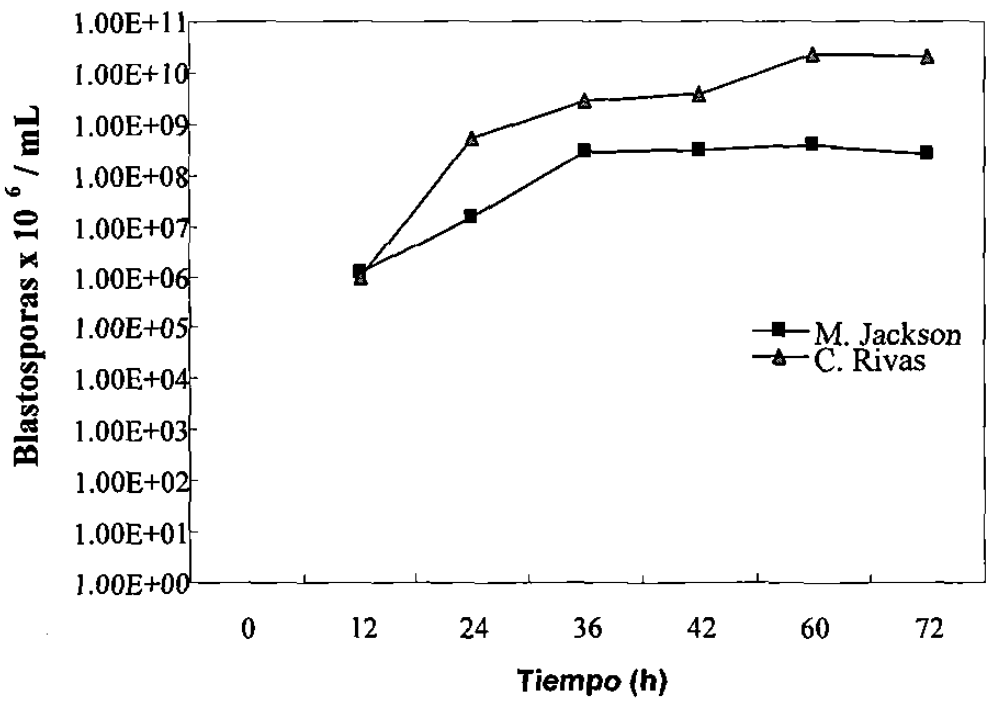

Figura 11. Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* a nivel de fermentador en dos medios de cultivo líquido.

En la Figura 11, se muestran los resultados obtenidos de la concentración final de blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas después de 72 h de fermentación en ambos medios de cultivo. El medio C. Rivas reporta (2.4 x 10^{10} blastosporas/mL), observando el inicio de su fase exponencial a partir de las 36 h con (2.7 x 10^{8} blastosporas/mL), punto a favor para la utilización del medio; porque es de gran interés debido a que deseamos obtener una producción de blastosporas mayor, en un tiempo más corto de fermentación y así disminuir costos.

Por otro lado, el medio M. Jackson demuestra tener desventaja en la producción de blastosporas con estas condiciones de agitación y aireación, en comparación al medio C. Rivas; ya que presento una producción de 2.7 x10^{8} blastosporas/mL (Figura 11). El medio M. Jackson inicia su fase exponencial muy lenta, se observa la máxima producción entre las 60 y 72 h de fermentación; contrario al otro medio que desde las 36 h, se observa producciones mayores de blastosporas hasta el final de la fermentación. Se aplico la prueba estadística *t* para evaluar si los dos medios de cultivo (M. Jackson y C. Rivas), diferían entre si de manera significativa respecto a sus medias, los resultados mostraron una alta diferencia significativa ($p<0.01$) entre los dos medios al producir las blastosporas se muestra en el apéndice I.

6.1.2. Cinética de crecimiento en base a Peso Seco:

Los resultados se muestran en la Tabla VII y Figura 12, con respecto al peso seco inicial obtenido en ambos medios, cuentan con un peso muy similar entre ellos debido a que comienzan con la misma concentración de inoculo, conforme avanza la fermentación se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo hasta la germinación después de 72 h de fermentación, donde el peso seco final logrado para ambos medios fue muy diferente, el medio peptona con 15.5 g/L tiene superioridad sobre el medio M. Jackson con solo 2.3 g/L. Se aplico la prueba estadística *t* para evaluar el peso seco de las blastosporas y tienen alto efecto significativo ($p<0.05$) al comparar ambos medios, se muestra en el apéndice J.

Tabla VII. Parámetros determinados en la producción de *P. fumosoroseus* cepa 612 en ambos medios a nivel fermentador después de 72 horas.

Medio de cultivo	Peso seco g/L	Azúcares Reductores g/L Consumidos
C. Rivas	15.5	73
M. Jackson	2.3	71

n=3

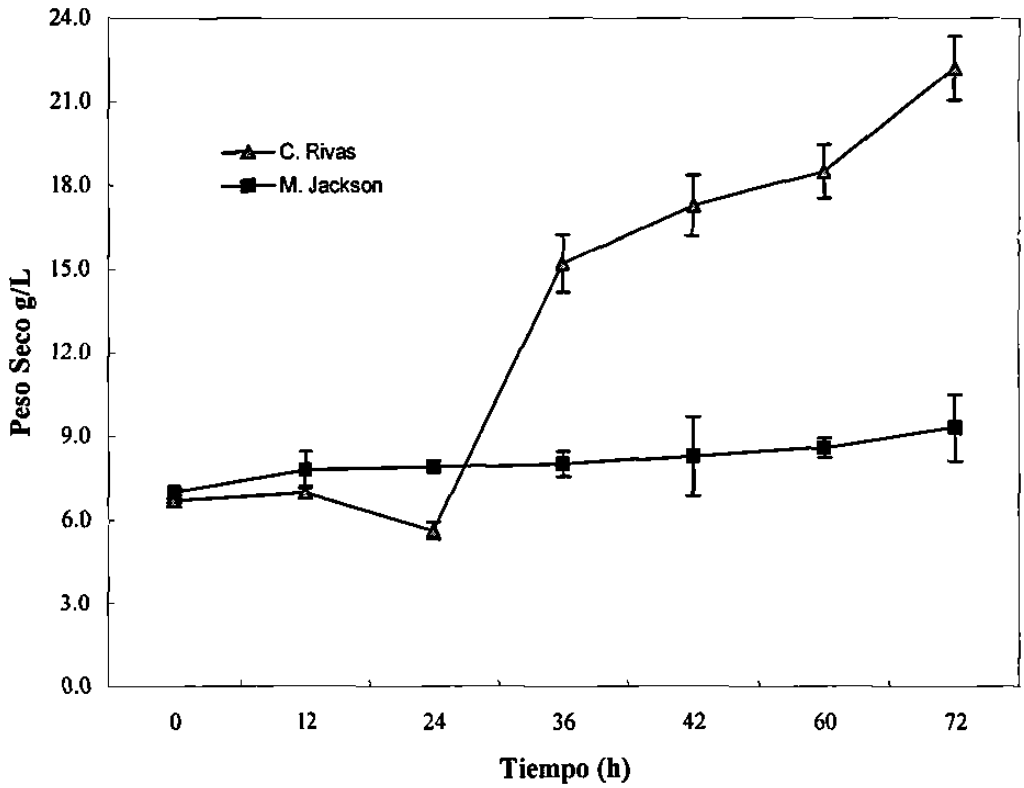

Figura 12. Cinética de crecimiento de *P. fumosoroseus* cepa 612 a nivel de fermentador de 14 L (28 °C, 520 r.p.m 72 h) en ambos medios de cultivo líquido. La gráfica muestra concentración de biomasa.

6.1.3. Cinética de crecimiento en base a Consumo de azúcares:

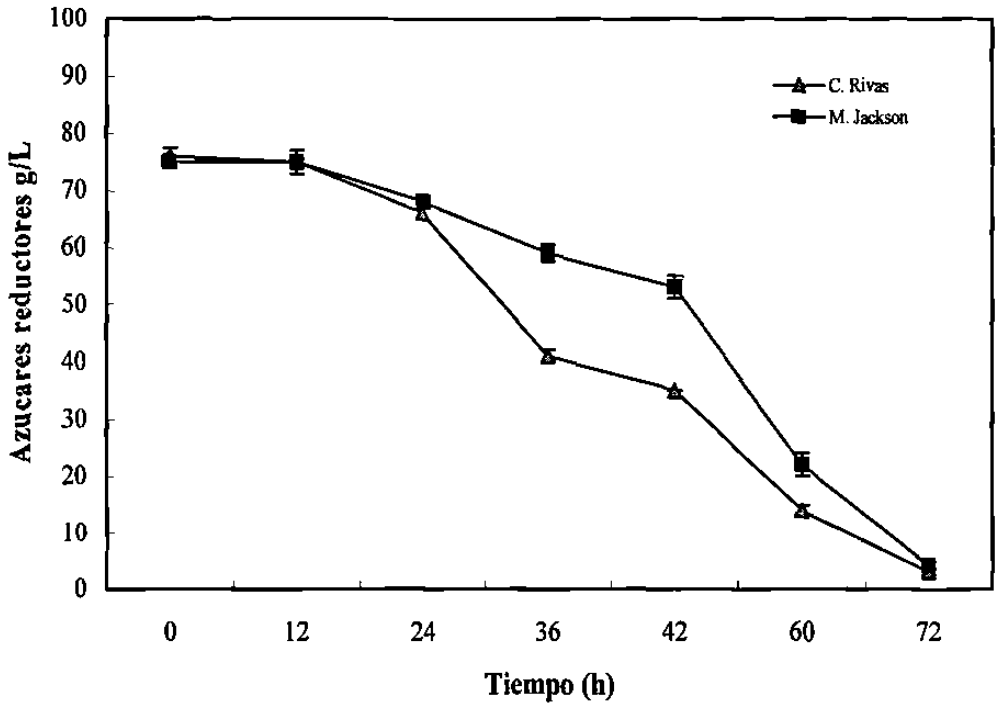

Figura 13. Cinética de crecimiento de *P. fumosoroseus* cepa 612 a nivel de fermentador de 14 L (28 °C, 520 r.p.m 72 h) en ambos medios de cultivo líquido. La gráfica muestra el consumo de azúcares.

La Tabla VII y Figura 13 muestra el consumo inicial del medio M. Jackson de (75 g/L) y del medio C. Rivas de (76 g/L) donde se observa que ambas muestras, comienzan su consumo de azúcar a la par, sin embargo conforme avanza el tiempo de la fermentación a las 36 horas, el medio C. Rivas eleva el consumo hasta (41 g/L), debido a que comienza su fase exponencial y por ello requiere más energía, agotando de esta forma la fuente de Carbono, presente en el medio de cultivo. El medio M. Jackson comienza su fase exponencial más tarde, de esta forma el consumo de azúcar se hace más notorio a las 60 horas con su disminución (22 g/L), debido a que presenta un mayor número de blastosporas ($4x10^7$ blastosporas/mL) en ese momento. El resultado de la prueba estadística *t* muestra diferencia significativa, entre ambos medios con respecto al consumo de azúcares, esto se observa en el apéndice K.

Como resultado del agotamiento de un nutriente esencial (la glucosa), ambos medios de cultivo llegaron al cese del crecimiento; con un consumo final (3 g/L) para el medio C. Rivas y (4 g/L) para el medio M. Jackson.

6.1.4. Coeficiente de Transferencia de Oxígeno (k_La):

Los valores de k_La se obtuvieron experimentalmente en ambos medios de cultivo a 28 °C en los fermentadores de 14 L, (con un volumen nominal de 5 L) por el método dinámico, con una condición de operación de 520 r.p.m 1 vvm. En la Tabla VIII se muestran los valores de k_La obtenidos los cuales son el promedio de 3 experimentos.

Tabla VIII. Valores de k_La obtenidos a 520 r.p.m y 1 vvm en ambos medios de cultivo.

Medio	Condición (agitación y aireación)	k_La (h^{-1})
C. Rivas	520 r.p.m 1 vvm	115.38
M. Jackson	520 r.p.m 1 vvm	115.38

n=3

La combinación de condiciones altas de propagación (520 r.p.m 1vvm), el microorganismo (hongo entomopatógeno) usado así como los medios de cultivo empleados para su propagación jugaron un papel importante, debido a la alta viscosidad que se logro en las fermentaciones desencadenaron una serie de efectos sobre el k_La; para obtener los valores del coeficiente de transferencia de oxígeno, se empleo la siguiente ecuación:

$$k_La = K(Pg/V)^{\alpha} (Vs)^{\beta}$$

Donde Pg/V es la potencia gaseada por volumen, Vs es la velocidad superficial del gas y K, α, y β son constantes empíricas.

Debido a la alta viscosidad que se tiene en ambos medios aunado a la agitación que se emplean, se sugiere tomar en consideración para posteriores estudios con este hongo, la utilización de la siguiente correlación para determinar el k_La (Bisaria V. and Panda A. 1991; Ramírez OT. 2004).

$$k_La = K' (P/V)^{\alpha} Vg^{\beta} \eta^{-\gamma}$$

Donde P / V es la potencia por unidad de volumen, Vg es la velocidad superficial del gas burbujeado, η es la viscosidad del medio de cultivo y K', α, β, y γ son constantes empíricas.

De esta forma se podrá en futuras investigaciones mejorar y enriquecer el bioproceso, mejorando la productividad del cultivo, donde se pueda tomar el coeficiente de transferencia de oxígeno como un parámetro de escalamiento para su implementación a nivel industrial.

6.1.5. Viabilidad de las blastosporas:

La importancia de la sobrevivencia de las blastosporas después de secadas y almacenadas radica en que las blastosporas germinan ya que en comparación con las conidias, estas (blastosporas) germinan más rápidamente en el hospedero. En conjunto esta habilidad y la de penetración en el hospedero proporcionan la patogenicidad (Jackson *et al.*, 1997).

La viabilidad de los extractos obtenidos en el fermentador y almacenados a 4°C de ambos medios de cultivo estudiados se muestra en la Figura 14 y corresponden al valor promedio de 3 experimentos. Con respecto a los resultados de este trabajo, las blastosporas recuperadas mostraron valores iniciales de 94 % de germinación para el medio C. Rivas y 97 % para el medio M. Jackson, después de su secado con la tierra de diatomeas, durante el primer mes (30 días) de pruebas en el
caldo de PDA, estas blastosporas logran un 81 % para C. Rivas y 87 % para M. Jackson, y se consideran aún con alto porciento de germinación. El resultado de la prueba estadística *t* muestra una alta diferencia significativa, al comparar la viabilidad de los medios de cultivo, en el transcurso de los días, esto se observa en el apéndice L.

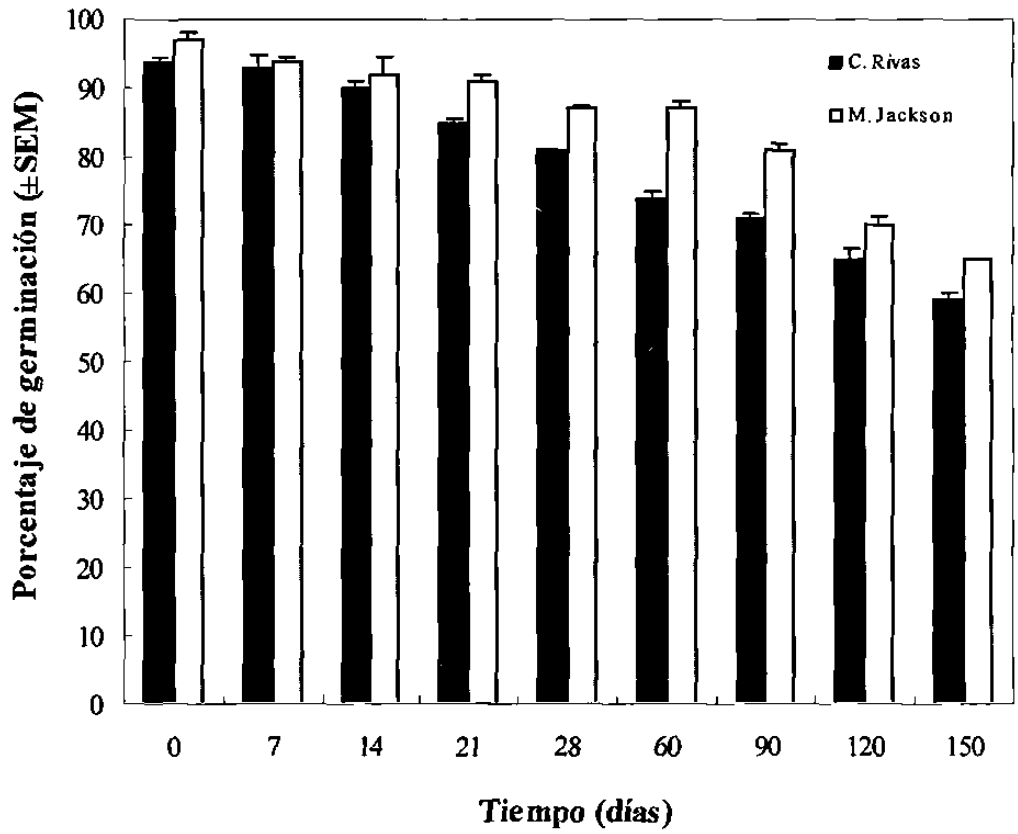

Figura 14. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en dos medios líquidos (M. Jackson y C. Rivas), a nivel fermentador de 14 L, almacenados a 4 °C y formulados con tierra de diatomeas, con porcentaje bajo de humedad.

Después de dos meses (60 días) de almacenadas se observa que carece de una disminución en la germinación con el medio M. Jackson porque sigue conservando el mismo porciento de germinación (87 %), mientras el otro medio baja 74 %. Después de 90 días aun se observa una buena germinación (81 %), con el medio M. Jackson el cual presenta una ligera ventaja del 10 % contra el medio C. Rivas, como se aprecia en la Figura 14 después de 4 meses (120 días) sigue disminuyendo la germinación, presentando un 65 % con las blastosporas recuperadas del medio C. Rivas, las cuales disminuyo más rápido a lo largo de los días y el medio M. Jackson conserva después de este periodo un buen porciento (70 %). Después de 5 meses (150 días) de almacenaje las blastosporas obtenidas reportan una disminución de 59 % para el medio C. Rivas y 65 % para M. Jackson (Figura 14).

Viabilidad de las blastosporas almacenadas sin ningún soporte. Para realizar esta evaluación, anteriormente se menciono la separación en dos partes de las blastosporas recuperadas de las fermentaciones realizadas para su obtención, una contiene un soporte (tierra de diatomeas) y las blastosporas como ingrediente activo, la segunda fue almacenada a 22 °C, solo las blastosporas y sin ningún soporte, guardadas en frascos de vidrio oscuro (los cuales no permiten la entrada de luz, para evitar la radiación ultravioleta, que afecta la germinación de las blastosporas, así como la actividad del hongo) Monzón, (2001). Los resultados correspondientes a este procedimiento se muestran en la Figura 15 donde se reporta el porcentaje de germinación de *P. fumosoroseus* con estas condiciones.

Al comienzo se obtiene entre un 98 y 96 % de germinación en ambos medios de cultivo (M. Jackson y C. Rivas). Ambos medios de cultivo pierden viabilidad a la par, resultando de esto un 45 % después de 150 días de almacenaje. Porcentajes altos de viabilidad solo se obtienen durante dos semanas, como se puede ver en la Figura 15. La prueba estadística *t* muestra que la viabilidad de las blastosporas sin formular, tiene un efecto significativo en el transcurso de los días, se muestra en el apéndice M.

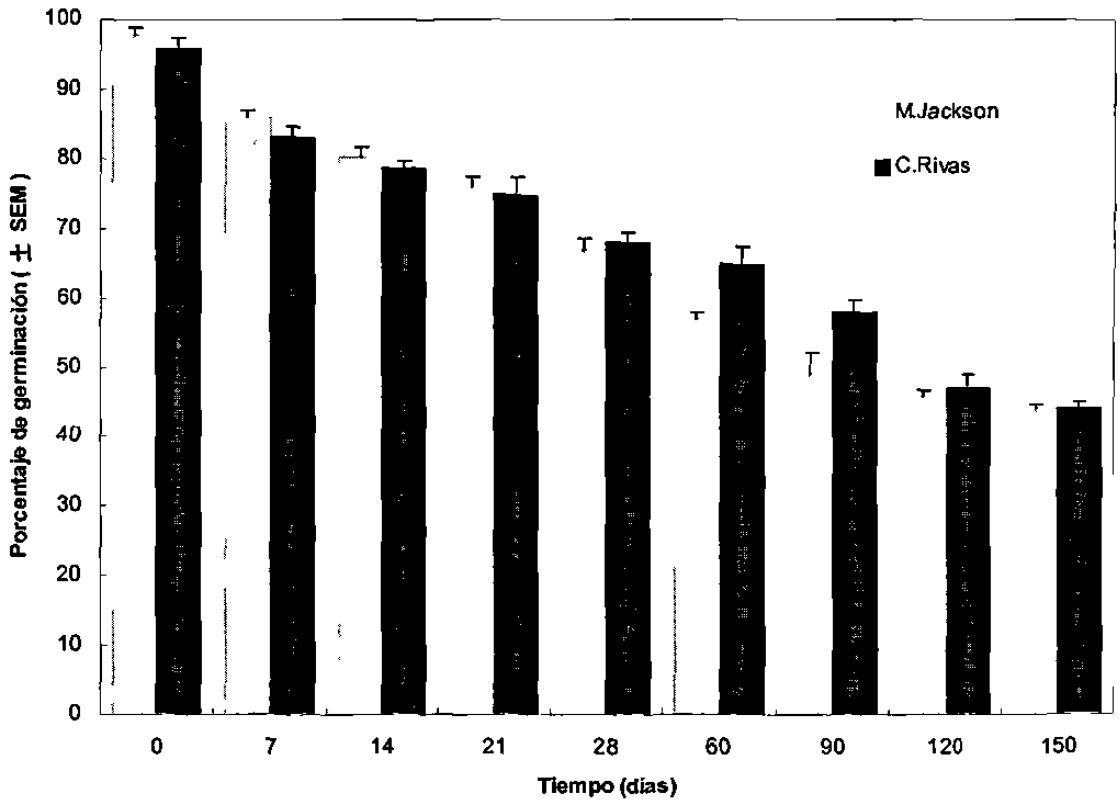

Figura 15. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en dos medios líquidos (M. Jackson y C. Rivas), a nivel fermentador, sin formular y almacenados.

6.1.16. Ventajas y Desventajas de la Fermentación en cultivo líquido:

Debemos recordar que en un cultivo líquido la producción y el control del proceso se simplifican en comparación a fermentaciones de cultivo sólido.

Además la utilización de biorreactores (modificados) con equipo de monitoreo y computacional, mejora la perspectiva de utilización de ellos, a nivel piloto debido a que se controlan las condiciones óptimas para la producción como son: la temperatura, aireación, pH, agitación y oxigenación. En este trabajo se controlo efectivamente la temperatura de crecimiento del hongo el cual se mantuvo siempre a 28 °C (temperatura adecuada reportado por Jackson *et al.*, 1997), el pH se mantuvo a lo largo de la fermentación entre 5.5 y 6.0, medida óptima de crecimiento (para su control se empleo NaOH 2N y H_3PO_4 2N), la agitación se conserva a 520 r.p.m y la oxigenación solo se monitorio durante la fermentación, y se registro el descenso durante el aumento de la producción de blastosporas.

Un factor importante a mencionar son los inconvenientes que se presentaron durante las fermentaciones, donde el factor más difícil de controlar, a pesar de contar con la instrumentación adecuada para su detención y control, en el modulo de fermentación fue la formación de espuma. Formada debido a la alta agitación (520 r.p.m), las características (nutrientes) de los medios de cultivo en estudio y de que se trato de un cultivo micelial (que aumento la viscosidad del medio de cultivo), presento un exceso espuma sóbresaliendo el medio C. Rivas, cabe recordar que el volumen de trabajo fue de 5 L, para solucionar este problema se empleo un antiespumante químico y una barrera mecánica colocada en la flecha de agitación.

Como menciona Crueger (1989) la espuma es un problema frecuente en las fermentaciones con sistemas aireados, un antiespumante químico puede ser siempre usado para la reducción de la espuma, pero tiene efectos inhibitorios en la fermentación. Se pueden utilizar varios métodos mecánicos que conserven condiciones estériles y puedan destruir la espuma.

La composición de los medios de cultivo es la clave más importante para la formación del producto. Y en el caso del medio C. Rivas, los medios elaborados con extracto de levadura y/o peptona proporcionan al hongo condiciones óptimas de crecimiento según Belova (1979); En el caso de los extractos de levadura son excelentes substratos para muchos microorganismos. Debido a que contiene aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos (Crueger, 1989); y este medio contiene estos elementos por lo que posiblemente puedo influir para la obtención de una gran cantidad de blastosporas, así como las condiciones de fermentación empleadas.

Con lo respecto al medio M. Jackson, cuenta con nutrientes ideales para la producción de blastosporas, debido a su fuente de carbono (Glucosa), y fuente de nitrógeno (Casaaminoácidos), según reporta Jackson *et al.*, 1997, varios estudios a nivel matraz han demostrado una alta producción de blastosporas haciendo recomendable el uso de este medio, pero cuando se trabaja a nivel de fermentador uno de los principales limitantes además de una alta producción, en la economía de los medios como se observa en la Tabla IX donde se muestran los costos de adquisición de los reactivos empleados en los dos medios.

Desafortunadamente muchos de los estudios existentes, sobre la utilización de este hongo, y con esta misma fuente de nitrógeno, están más enfocados a estudios nutricionales (para obtener mayor resistencia de desecación y almacenamiento) y no a mejorar y/o obtener producciones de blastosporas altas; lo cual se puede lograr a través del uso de fermentadores y empleo de cultivos sumergidos. Por tal motivo se sugiere para posteriores investigaciones, una integración de ambas (nutrición y producción) para lograr el éxito total, del empleo de Hongos Entomopatógenos.

Basado en esta observación el objetivo de esta investigación fue la producción masiva de *P. fumosoroseus* a nivel fermentador, combinado con la utilización de la variación de la fuente de nitrógeno la cual involucra bajos costos, además de lograr la resistencia a la desecación y mejoramiento de la vida de anaquel.

Tabla IX. Costo por kilo de ingrediente empleado en la formulación de los medios de cultivo.

Ingrediente	**Costo en pesos** (por kilo de ingredientes)
Fuente de carbono	
Glucosa	11.00
Fuente de nitrógeno	
Casaaminoácidos	7000
Peptona	160.00
Extracto de levadura	95.00
	Costo final
Medio M. Jackson	7011
Medio C. Rivas	266

Cotizado en pesos mexicanos
(Casaaminoácidos, Glucosa, Probiotek Peptona y Extracto de levadura, Sensient)

160688

6.2. Efectividad biológica de *P. fumosoroseus* contra *B. argentifolii*:

Los enemigos naturales de una especie de insectos son muy específicos para esa especie, es decir, son enemigos de determinado insecto y no atacan a todos los demás insectos, y su utilización preserva el ecosistema (Bolívar, 2004). La utilización de hongos entomopatógenos nos ofrece este mismo beneficio, por ende las investigaciones se enfocan en el estudio y empleo de estos.

Este trabajo evaluó la efectividad biológica de la cepa Pfr-612 (*P. fumosoroseus*), obtenida anteriormente se recuperaron blastosporas y se emplearon como ingrediente activo, de dos fuentes de nitrógeno distintas para ello (M. Jackson y C. Rivas) para su utilización se formularon blastosporas con tierra de diatomeas (Polvo) y una suspensión (Caldo de fermentación); el bioinsecticida comercial Specifik® (*P. fumosoroseus*) + Rhudo (Jabón agrícola) como testigo biológico y el insecticida químico Endosulfan + Rescate 20 PS (Acetamiprid) como testigo químico para el control de la mosquita blanca *B. argentifolii* (Bellows & Perring) en una parcela experimental de algodón (DP-5415), localizada en Matamoros, Coahuila.

Se probó la eficiencia de los diferentes tratamientos contra los diferentes estadios de la mosquita blanca *B. argentifolii* durante tres fechas de muestreo, después de una sola aplicación.

En el apéndice O y Tabla X se observa la mortalidad de las ninfas durante el primer muestreo al segundo día después de su aplicación, donde sobresalen 3 de los 7 tratamientos del estudio, el tratamiento con el medio C. Rivas presenta alto promedio de ninfas infectadas (80.52 %) tanto con la formulación líquida (Caldo de fermentación), como con la formulación en polvo con 76.3 % ambas usando una dosis media. La cual se determino usando como base 1 x 10^{11} esporas / ha, el cual corresponde al número de esporas que contiene el producto comercial biológico Specifik®. El producto comercial (Specifik®) es el tercer tratamiento con mayor porciento de infección con 72.44 % cuya composición es *P. fumosoroseus*, coadyuvantes (tierra de diatomeas micronizada) y protectores solares. El 80.52 % y el 76.3 % de mortalidad (por infección) que presento el medio C. Rivas a los dos días de la única aplicación parece ser un buen presagio, para el uso de este hongo entomopatógeno.

Tabla X. Número y porcentaje de ninfas vivas, infectadas y parasitadas de *B. argentifolii*, al segundo día después de la aplicación de los tratamientos, en el cultivo del algodón.

Tratamiento	Dosis	Ninfas Vivas	Ninfas Inf./Muertas	% de Ninfas Inf./Muertas	Ninfas Parasitadas	% Ninfas Parasitadas	Ninfas Totales
	Baja	63.4 ebdac *	27.7 ba	47.7 bac	23.5 ba	25.9 bdc	114.6 bac
MJ_1	Media	153.3 a	77.7 a	38.5 bc	29.7 ba	15.7 edc	260.7 a
	Alta	69.8 ebdac	40.8 ba	48.9 bac	47.1 a	31.3 bac	157.7 ba
Promedio		**95.5**	**48.7**	**45.1**	**33.4**	**24.3**	**177.7**
	Baja	58.9 bac	26.6 ba	37.1 c	21.3 ba	23.1 bedc	106.8 bac
MJ_2	Media	38.5 ebdac	37.3 ba	52.7 bac	67.2 a	48.3 a	143.0 bac
	Alta	11.0 edc	22.9 ba	68.2 bac	3.7 c	11.3 ed	37.6 c
Promedio		**36.1**	**28.9**	**52.7**	**30.7**	**27.6**	**95.8**
	Baja	25.7 ebdac	21.3 ba	41.8 bc	8.2 bc	21.1 edc	55.2 bc
CR_3	Media	11.0 e	28.4 ba	76.3 a	9.9 bc	19.1 edc	49.3 bc
	Alta	18.8 ebdc	20.9 ba	53.0 bac	4.5 c	10.9 ed	44.2 bc
Promedio		**18.5**	**23.5**	**57.0**	**7.5**	**17.0**	**49.6**
	Baja	47.8 bdac	21.7 ba	37.9 c	18.0 ba	21.0 bedc	87.5 bac
CR_4	Media	9.1 ed	42.9 ba	80.5 a	5.0 c	7.8 e	57.0 bc
	Alta	33.5 ebdac	14.2 b	36.0 c	10.4 bc	20.2 edc	58.1 bc
Promedio		**30.1**	**26.3**	**51.5**	**11.1**	**16.3**	**67.5**
Specifik®	---	11.8 ebdc	58.6 ba	72.4 ba	9.1 bc	12.1 ed	79.5 bac
Endosulfan	---	9.3 ed	39.8 ba	77.1 a	10.0 bc	18.7 edc	59.1 bc
Testigo (sin aplicar insecticida)	+	61.6 ba	0.0 c	0.0 d	40.8 a	40.4 ba	102.4 bac

* Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas
+ Aplicación con agua solamente --- Dosis recomendada por el fabricante

CR a base de peptona de colágeno (CR_3-polvo, CR_4 liquido)
MJ a base de casaaminoácidos (MJ_1-polvo, *MJ_2-liquido*)

Con respecto al Endosulfan + Rescate 20 PS debido a que son productos químicos se esperaba un porciento de ninfas muertas más alto y más rápido que el porciento de ninfas infectadas (por el hongo), pero en la primera fecha de muestreo al segundo día después de aplicación solo se reporta un 53.57 %, y muestran ventaja los bioinsecticidas aplicados. Durante el primer muestreo (Tabla X) los tratamientos elaborados con el medio (M. Jackson) a base de casaminoácidos en ambas formulaciones (Polvo y Caldo de fermentación), presenta una mortalidad menor (por infección) destacando solamente con un 68.16 % la formulación líquida (Caldo de fermentación), en su dosis alta, seguida de la dosis media con 52.66 %. Mientras que el otro tratamiento (formulación en polvo) solo muestra desde un 38.52 % de ninfas infectadas hasta un 47.73 % en todas las dosis.

Los resultados correspondientes al segundo muestreo al cuarto día después de la aplicación, en la Tabla XI, apéndice P. Revelan que medio M. Jackson con la formulación en polvo presenta un ligero repunte del 75.63 % de ninfas infectadas por el hongo, con una dosis alta de aplicación. Pero esta tendencia no se observa con la dosis media, ni baja donde ambas tienen entre 56.65 y 53.83 %. Con la formulación líquida (Caldo de fermentación), las tres dosis de muestran un rango de mortalidad (ninfas infectadas) entre 40 % y 55 %, presenta poca efectividad, considerando que se busca al aplicar los bioinsecticidas una alta infestación en un menor tiempo.

Al parecer la formulación líquida del medio C. Rivas, presenta un proceso de infección más rápido, ya que la dosis media durante el primer muestreo tiene alto porcentaje de infección (80.52 %) mientras a los 4 días reporta 68.62 % de ninfas infectadas, pero esta tendencia solo se logra apreciar con esta dosis, porque el resto de las dosis (alta y baja) elevan la efectividad sobresaliendo la dosis alta con 35.98% a los dos días después de la aplicación y 67.56 % al cuarto día, la dosis baja presento 37.9% llega hasta 53.39 % (Tabla XI) después del cuarto día.

El testigo biológico (Specifk®) muestra una reducción considerable de efectividad (40.03 %) al cuarto día, disminuye hasta un 30 %, considerable ya que al principio del experimento logra 72 % de ninfas infectadas. La mezcla de Endosulfan + Rescate 20 PS presenta 31.76 % de ninfas muertas al cuarto día, lo que indica la perdida de efectividad en contra de *B. argentifolii* sobre este cultivo.

Tabla XI. Número y porcentaje de ninfas vivas, infectadas y parasitadas de *B. argentifolii*, al cuarto día después de la aplicación de los tratamientos, en el cultivo del algodón.

Tratamiento	Dosis	Ninfas Vivas	Ninfas Inf./ Muertas	% de Ninfas Inf./ Muertas	Ninfas Parasitadas	% Ninfas Parasitadas	Ninfas Totales
MJ_1	Baja	24,3 ba *	28,2 ebdc	53,8 bac	12,5 bdac	16,7 bc	65,0 bac
	Media	61,7 ba	69,9 bac	56,7 bac	24,4 bac	16,4 bc	156,0 ba
	Alta	12,2 b	44,0 ebdac	75,6 a	37,0 ba	33,6 ba	93,2 bac
		32,7	**47,4**	**62,1**	**24,6**	**22,3**	**104,7**
MJ_2	Baja	55,7 ba	20,9 edc	40,2 c	22,8 bac	28,2 bac	99,4 bac
	Media	40,7 ba	43,1 bdac	55,8 bac	40,4 a	32,8 ba	124,2 a
	Alta	28,5 ba	25,6 ebdc	51,3 bac	6,8 dc	10,8 c	60,9 bac
Promedio		**41,6**	**29,9**	**49,1**	**23,3**	**23,9**	**94,8**
CR_3	Baja	22,1 ba	18,8 edc	43,4 bc	6,1 bdc	13,8 bc	47,0 bac
	Media	16,0 ba	15,9 ed	48,0 bc	3,8 d	9,7 c	35,7 c
	Alta	31,7 ba	20,8 ed	39,8 c	8,4 dc	14,4 bc	60,9 bc
Promedio		**23,3**	**18,5**	**43,7**	**6,1**	**12,6**	**47,9**
CR_4	Baja	19,9 ba	21,9 ebdc	53,4 bac	9,6 bdac	18,4 bc	51,4 bac
	Media	31,2 ba	76,9 a	68,6 ba	16,5 bdac	12,1 c	124,6 a
	Alta	35,4 ba	70,1 a	67,5 ba	12,7 bdac	11,1 c	118,2 ba
Promedio		**28,8**	**56,3**	**63,2**	**12,9**	**13,9**	**98,1**
Specifik®	---	21,0 ba	19,4 e	40,0 c	14,5 bdac	26,8 bac	54,9 bac
Endosulfan	---	48,4 ba	13,9 ed	31,7 c	19,4 bdac	26,3 bac	81,7 bac
Testigo (sin aplicar insecticida)	+	41,9 a	0,0 f	0,0 d	44,5 a	44,3 a	86,4 bac

*Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas
+ Aplicación con agua solamente --- Dosis recomendada por el fabricante
CR a base de peptona de colágeno (CR_3-polvo, CR_4 líquido)
MJ a base de casaaminoácidos (MJ_1-polvo, MJ_2-líquido)

En la Tabla XII, se observa que los algunos de los productos formulados en el laboratorio después de seis días después de la aplicación, aun siguen con un porcentaje considerablemente alto de mortalidad entre los que se encuentran medio M. Jackson formulación en polvo dosis alta (65.95 %), medio C. Rivas polvo dosis media (63.92 %), y formulación líquida (Caldo de fermentación) dosis baja (63.01%). Los puntos a resaltar con este trabajo seria el comportamiento opuesto de los dos productos formulados donde el medio M. Jackson empieza a infectar conforme avanza el tiempo de muestreo podría decirse que el hongo en este medio de cultivo tarda en lograr las condiciones ideales de infestación mencionadas anteriormente.

Mientras el medio C. Rivas con ambos tipos de formulaciones desde el primer día de muestreo después de la aplicación, se logra observar porcentajes altos de infección sin olvidar que este efecto no se logra en todas las dosis que se emplearon, como eran de esperarse solo algunos serian las mejores para considerar. Con respecto a las dosis de los tratamientos, existe entre ellos alta diferencia significativa (apéndice Q) entre medios y formulados.

Como se observa en la Tabla XII el comportamiento en el medio M. Jackson formulación en polvo cuenta con un efecto ascendente con respecto a la dosis, la baja de 45.35 %, media de 56.03 % y alta de 65.95 %; mientras que en la formulación líquida (Caldo de fermentación) la dosis alta es la única que reporta una mortalidad mayor de 56.08 %. La dosis baja tiene un efecto, de menos a más pues comienza con 37.13 % y logra al final 55.67 % durante las tres fechas de muestreo.

Tabla XII. Número y porcentaje de ninfas vivas, infectadas y parasitadas de *B. argentifolii*, al sexto día después de la aplicación de los tratamientos, en el cultivo del algodón.

Tratamiento	Dosis	Ninfas Vivas	Ninfas Inf./ Muertas	% de Ninfas Inf./ Muertas	Ninfas Parasitadas	% Ninfas Parasitadas	Ninfas Totales
	Baja	26,5 ba*	20,0 d	45,4 ba	12,4 bdac	21,0 cbd	58,9 dc
MJ_1	Media	64,6 a	68,8 ba	56,0 ba	27,1 ba	18,5 cebd	160,5 ba
	Alta	30,0 ba	47,9 bdac	65,9 a	23,5 ba	22,6 cbd	101,4 bdac
Promedio		**40,4**	**45,6**	**55,8**	**21,0**	**20,7**	**106,9**
	Baja	34,6 ba	33,7 bdc	55,7 ba	24,5 ba	26,3 cb	92,8 bdac
MJ_2	Media	38,9 ba	31,9 dc	41,6 b	16,4 bac	20,4 cebd	87,2 bdac
	Alta	13,4 b	17,6 d	56,1 ba	2,5 d	7,3 e	33,5 d
Promedio		**29,0**	**27,7**	**51,1**	**14,5**	**18,0**	**71,2**
	Baja	17,8 ba	16,7 d	46,4 ba	4,0 dc	9,7 ed	38,5 dc
CR_3	Media	18,8 ba	37,9 bdac	63,9 ba	9,7 bdc	12,9 ced	66,4 bdc
	Alta	3,0 ba	38,1 bdc	60,0 ba	14,8 bdc	12,0 ced	87,9 bdc
Promedio		**23,9**	**30,9**	**56,8**	**9,5**	**11,5**	**64,3**
	Baja	23,9 ba	37,1 bdac	63,0 ba	14,5 bdac	16,4 cebd	75,5 bdac
CR_4	Media	31,6 ba	47,6 bac	59,7 ba	15,0 bdac	14,0 cebd	94,2 bac
	Alta	55,2 a	81,8 a	61,9 ba	28,9 a	17,9 cebd	165,9 a
Promedio		**36,9**	**55,5**	**61,5**	**19,5**	**16,1**	**111,9**
Specifik®	---	38,1 ba	23,9 dc	42,3 ba	14,2 bac	20,0 cebd	76,2 bdac
Endosulfan	---	32,6 ba	28,9 bdc	44,9 ba	27,8 ba	28,4 b	89,3 bdac
Testigo (sin aplicar insecticida)	+	41,8 ba	0,0 e	0,0 c	63,2 a	49,1 a	105,0 bdac

* Medias con la misma letra no presentan diferencias significativas
+ Aplicación con agua solamente --- Dosis recomendada por el fabricante
CR a base de peptona de colágeno (CR_3-polvo, CR_4 líquido)
MJ a base de casaaminoácidos (MJ_1-polvo, MJ_2-líquido)

Finalmente en este trabajo se logra englobar los requisitos necesarios en lo que la biotecnología se enfoca para el éxito de esta; como seria 1) el desarrollo del producto (donde se logra tener una producción superior de blastosporas con respecto a dos medios de cultivo líquido, usando los fermentadores y condiciones de propagación adecuadas para el hongo) 2) formulaciones con mayor vida de anaquel (probando el uso de blastosporas contenidas en el caldo de fermentación sin ningún soporte o aditivo, blastosporas secadas y tratadas con tierra de diatomeas como soporte y con esta forma se logro la sobrevivencia por un mayor tiempo) 3) efectividad y permanencia en el campo (obteniendo buenos porcentajes de mortalidad sobre *B. argentifolii* con los productos obtenidos en el laboratorio con respecto a los testigos donde el control químico obtuvo menor efectividad, el control biológico tuvo un porcentaje alto de mortalidad por muy pocos días; Por consiguiente los productos obtenidos, así como las formulados tienen una permanencia mayor en el cultivo de algodón).

7. DISCUSIÓN

Las concentraciones de blastosporas logradas con ambos medios de cultivo al final de la fermentación (72 h), observadas en la Figura 11 sugieren como alternativa la utilización de una fermentación tipo "Fed-batch" (semi-alimentado), donde se pueda añadir sustrato a medida que se consume, manteniendo su concentración de blastosporas constante.

Humphreys *et al.*, (1990), hace referencia de la utilización de cultivos "batch" y "feed batch", pero limitados por glucosa y amonio; donde observaron que *P. farinosus* y *B. bassiana* produjeron blastosporas en la fase exponencial y desaceleración de crecimiento en el cultivo "batch", mientras que *B. bassiana* solamente formo esporas durante la fase estacionaria. Con respecto al cultivo "Fed-batch" limitado por glucosa y amonio, la concentración de blastosporas para *P. farinosus* fue inversamente relacionada con la tasa de dilución.

Reportes anteriores mencionan la utilización de una fuente de nitrógeno similar al medio en estudio, al igual que nosotros con una alta producción de blastosporas, a escala de fermentador; como por ejemplo en (1986) Latgé y cols. Reportan un medio especifico de glucosa y extracto de levadura para *B. bassiana* obtuvieron altas concentraciones de propágulos (1 x 10^9 blastosporas/mL), para (1996) De la Torre y Cárdenas Cota; Reporta la obtención de (5.0 x 10^8 esp/mL) conidios de *P. fumosoroseus* en un fermentador de 20 L (400 r.p.m y 1.5 vvm) con una fuente de carbono simple (glucosa (30 g/L), y nitrato de amonio (0.7 g/L) y suplementado con extracto de levadura como fuente de nitrógeno), en el medio de cultivo.

Quintero-Zapata (2001), empleo este mismo hongo en un medio a base de (sacarosa 2.0 g y peptona de colágeno 4.5 g), logro una producción de (1.48 x 10^8 blastosporas/mL) en 24 h de fermentación con las mismas condiciones de propagación anteriores (400 r.p.m y 1.5 vvm), y en condiciones menores de propagación (250 r.p.m) 1.3x 10^8 blastosporas/mL pero después de 3 h de fermentación, en un micro fermentador de 5 L (Bioflo III, New Brunswick Scientific Co. Inc. USA).

Estas referencias corroboran que los medios con esta fuente de nitrógeno (por ejemplo: peptona y extracto de levadura), pueden ayudar a mejorar la producción, además si se mejoran las condiciones de propagación en el fermentador utilizado, como se realizo en este estudio con una agitación a 520 r.p.m y solo una aireación de 1.0 vvm se logro concentración alta de blastosporas como las observadas en la Figura 11, donde el medio C. Rivas tiene después de 72 h, 2.4 x 10^{10} blastosporas/mL. Elías-Santos, (2002) realiza una serie de experimentos utilizando en este caso las mismas fuentes de C:N en los medios de cultivo que este estudio (M. Jackson y C. Rivas) y menciono que las diferentes condiciones de agitación y aireación; puede ser factor determinante para la producción de *P. fumosoroseus*.

Además reporta una producción a nivel fermentador de (13.0×10^8 blastosporas/mL), y emplea condiciones de agitación menores y aireación en particular esta (400 r.p.m 0.5 vvm), en el medio M. Jackson, mientras que con velocidades mayores (520 r.p.m y 1 vvm), reporta, (1.0×10^8 blastosporas/mL). Sin embargo este efecto no se presenta en este experimento, debido a que se obtuvo un porcentaje mayor al reportado por Elías-Santos (2002).

Mientras que Vargas-Guevara, (2004) reporta también producciones bajas de esporas, pero de *B. bassiana* (5.9×10^8 esp/mL), empleando los casaaminoácidos a nivel matraz (300 r.p.m), comparado con el utilizado, otras fuentes de nitrógeno como nitrato de amonio obtiene (7.5×10^8 esp/mL) y con líquido remojo de maíz (6.4 x 10^8 esp/mL), además de corroborar que la fuente de nitrógeno y su relación con la fuente de carbono, en los medios de cultivo es de vital importancia tanto para la producción del propagulo, tolerancia a la desecación y almacenaje.

Mientras que Vega *et al.*, (1997) reporta una producción de 1.2 x 10^9 blastosporas/mL, con el medio de Jackson *et al.*, (1997) a nivel matraz en 300 r.p.m para la germinación de blastosporas de *P. fumosoroseus* en la cutícula de *B. argentifolii*. Varias investigaciones realizadas anteriormente con *P. fumosoroseus*, han reportado la utilización de C:N en una proporción de 10:1, con una agitación de 300 r.p.m a nivel matraz durante 3 días, con una producción final de 8.8 x 10^8 esporas/mL con 100 % de blastosporas en el medio de cultivo final (Jackson *et al.*, 1997). Otro ejemplo de producción con casaaminoácidos lo reporta Vidal *et al.*, (1997) con la cepa Pfr-92117 a nivel matraz, donde después de 48 h obtiene una producción de (1.3×10^8 propágulos). Como se puede ver en los reportes antes mencionados, son pocos los resultados a nivel fermentador con este medio en particular, ya que este es un medio de alto costo, haciéndolo poco factible su utilización a escalas mayores. Sin embargo la desventaja y de ser un medio de producción más cara, no se podría descartar de todo su utilización, debido a diferentes reportes donde se reportan altas concentraciones de blastosporas y posiblemente tiendan a ser efectivas para el control de mosquita blanca.

Este dato seria correcto si consideramos la observación de Cliquet (1999), donde reporta que el máximo peso seco esta asociado con la máxima producción de blastosporas; y este fue el caso del medio C. Rivas que logra una mayor producción de blastosporas, en este trabajo.

El peso seco final logrado para ambos medios fue muy diferente, el medio peptona con 15.5 g/L tiene superioridad sobre el medio M. Jackson con solo 2.3 g/L, la explicación seria según menciona Samsinakova (1966) en *B. bassiana* menciona que el peso seco en cultivos sumergidos a los tres días, no existe aumento sustancial en peso seco porque las esporas son formadas principalmente por la desintegración del micelio y estos pesan menos que las hifas; en cultivos aeriales por ejemplo la producción de peso seco incrementa lentamente hasta el cuarto día cuando sube al máximo, y se logra en el noveno día de fermentación. Además es importante no olvidar que el rendimiento de biomasa y de producto representa la eficacia de la conversión del substrato a biomasa y productos (Tabla VII y Figura 12).

Datos de peso seco con estos mismos medios de cultivo, son reportados por Lozano, (2001) a nivel matraz de 500 mL, donde el mayor rendimiento se observo en el medio M. Jackson con (11.5 g/L) y (7.7 g/L) en medio C. Rivas, en esta ocasión no se logro el mismo patrón porque el medio con mayor rendimiento fue el medio C. Rivas, sin embargo obtuvo mayor número de esporas al finalizar la fermentación; sin importar el medio de cultivo, siempre el rendimiento en un fermentador es mayor al obtenido en matraz, pero este dato es importante pues puede darnos un panorama de que se podría obtener en posteriores trabajos a nivel fermentador con este hongo (*P. fumosoroseus*).

Datos similares mencionan Gómez (1999), También en matraz con 3 medios de cultivo diferentes, con promedios de 15.6 g/L para el medio casaaminoácidos, 10.7 g/L con medio peptona y 6.2 g/L con un medio a base de melaza. La disminución en el peso en este último medio (melaza) se puede atribuir a que contiene gran cantidad de sólidos en suspensión, que al llevarse a cabo el proceso de filtración compiten en espacio con las blastosporas producidas, sin embargo, el medio M. Jackson y el medio C. Rivas son medios de cultivo con componentes altamente hidrosolubles y son eliminados casi totalmente al filtrarse, y se obtiene una muestra más representativa de la producción (Inch *et al.*, 1986).

Otro factor importante a considerar; es que sin importar que se trate del mismo microorganismo, el peso seco es diferente entre los medios de cultivo empleados. Debido a las fuentes de carbono y de nitrógeno que se utilizan para su elaboración contienen y/o pueden tener elementos indeseables (como por ejemplo: impurezas y/o elementos poco solubles), los cuales pueden contribuir en algún momento, aumentando el peso, de tal modo se ve alterado el resultado.

Esto lo observaron los siguientes trabajos: Thomas *et al.*, 1987 obtuvo 2.8 g de biomasa/L de *B. bassiana* con fructosa como fuente de carbono, Rombach, (1989) a nivel fermentador con este mismo hongo, uso un medio de cultivo líquido a base de sacarosa, maltosa y extracto de levadura, logra en su máxima producción solo 12.3 mg / mL. En (1997) Vidal *et al.*, uso tres diferentes medios de cultivo líquido, donde el crecimiento varia con el medio utilizado, la máxima producción de peso seco lo obtuvo después de 42 h de fermentación en el medio reportado por Jackson *et al.*, (1997) con 60.3±4.9 mg/mL^{-1}, medio Catroux (fuente de C con sacarosa) con 38.5±2.4 mg/m^{-1} y Paris un medio semi-sintético con maltosa con 20.7±3.1 mg/mL^{-1}.

El resultado de k_La que muestran ambos medios de cultivo fueron valores "muy altos" (115.38 h^{-1} para ambos medios) se puede observar en la Tabla VIII; este valor se esperaba debido a la fermentación micelial que se realizó, y el k_La puede variar durante la fermentación por varias razones, principalmente por el aumento de la viscosidad, los problemas de espuma y el aumento de la concentración celular; los cuales se involucran cuando se trata de fermentaciones miceliales como en este caso. Aun así Quintero, (1981) reporta valores típicos de k_La para tanques agitados mecánicamente de 60 h^{-1} hasta 240 h^{-1} sin microorganismos de tal manera nuestros valores estarían dentro de un rango aceptable.

Investigaciones anteriores con este microorganismo (*P. fumosoroseus*) reportan valores de k_La a diferentes condiciones de r.p.m y vvm, donde en condiciones muy bajas de agitación (200 r.p.m y 0.5, 1 vvm) tiene 7.2 h^{-1}, 11.16 h^{-1} respectivamente mientras en condiciones de alta agitación (520, 590, 600 r.p.m 1 vvm) tiene 115.38 h^{-1}, 143 $h\text{-}^{1}$, 167.3 h^{-1} (Elías-Santos, 2002). Según Cliffe, (1997) el k_La depende de las propiedades físico - químicos del medio del biorreactor y de las propiedades físicas y condiciones de operación del recipiente. El valor del coeficiente volumétrico de transferencia de masa k_La puede ser controlado por las condiciones de agitación y el flujo de aire.

Por lo tanto al obtener y repetir el mismo valor de k_La 115.38 h^{-1} con las mismas condiciones de operación y medio de cultivo, en este estudio podríamos en futuras investigaciones tomar este valor para controlarlo durante todo el proceso; si se toma como ejemplo el trabajo de Bartholmew en (1950) el cual hace una manipulación de los coeficientes de transferencia de masa gas-líquido calculados utilizando la oxidación del sulfito de sodio a través de hacer cambios en la velocidad de flujo de aire, se obtienen varias concentraciones de penicilina a diferentes velocidades de agitación, aun mantiene el k_La constante. Lo anterior propone utilizar el k_La como un criterio de escalamiento, para nuestro proceso.

La viabilidad de los extractos obtenidos en el fermentador, almacenados a 4°C de ambos medios de cultivo estudiados se muestra en la Figura 14, con un porciento alto de viabilidad al inicio del trabajo, sin embargo al concluirlo después de 150 días de almacenaje las blastosporas obtenidas reportan una disminución de 59% para el medio C. Rivas y 65% para M. Jackson, datos similares reporta Quintero-Zapata (2001); después de secar las muestras por aire con 5 % de tierra de diatomeas la viabilidad se afecto ligeramente entre 85 % y 97 %, realizó viabilidad con las blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas en diferentes medios de cultivo (a base de harina de soya a diferentes concentraciones) donde la sobrevivencia al terminar su proceso fue de 90 a 100 % en todos los medios; por lo que después de 60 días disminuyó considerablemente en algunos casos hasta un 29 % y solo el medio control a base de casaaminoácidos logro una sobrevivencia del 75%.

Esta perdida tan drástica después de secadas con la tierra de diatomeas que se observo en su experimento, no ocurrió en este trabajo posiblemente por el método empleado; ya que al usar la centrifuga (mini sharples) para el secado, las blastosporas se benefician de alguna forma, además del soporte utilizado en este caso (tierra de diatomeas). Según Hernández *et al.*, 1997 formularon conidias de *Paecilomyces* spp con polvos humectantes como tierra de diatomeas y bentonita logrando mantener la viabilidad del hongo, entre 90 y 99 % por 45 días.

Cabe mencionar que una limitante biotecnológica para el uso masivo de *P. fumosoroseus* es la baja viabilidad de las cepas y esporas en el medio ambiente. Por tal motivo, la preocupación constante radica en encontrar sistemas de producción y aplicación eficientes, que le permitan al hongo mantenerse por más tiempo en anaquel (Pereira, 2000). Una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% en un tiempo de incubación de 24 horas, ya que al asperjar en el campo el hongo debe tener un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto período de exposición a condiciones ambientales (Vélez *et al.*, 1997). Esto explica porque todos los tratamientos probados tuvieron un alto porciento de viabilidad en las primeras semanas; todas estas limitantes se pueden desaparecer al realizar la formulación adecuada y el empleo del soporte ideal, para cada microorganismo, lo cual nos puede llevar a muchos años de investigación y desarrollo.

Las muestras recuperadas de los medios en estudios se almacenaron a 4°C, por sugerencia de varios estudios, donde demuestran que las blastosporas de los hongos entomopatógenos se ven favorecidas a estas condiciones por ejemplo: Clerk y Madelin (1965) y Daoust y Pereira (1986) demostraron que la temperatura y humedad afectan el índice de sobrevivencia y germinación en *B. bassiana*; la temperatura afecta el porcentaje de germinación en las conidias y después afecta también la concentración de la unidad infectiva en el campo Walstad *et al.*, 1970; Jackson *et al.*, 1997 mencionan que la temperatura influye en la viabilidad de las blastosporas de *P. fumosoroseus* sobre todo almacenadas a 22 °C donde son poco viables después de 30 días; además Lozano, (2001) reporta porcentajes de

viabilidad con Pfr a 22 °C y 4 °C con los mismos medios de cultivo que este trabajo, después de 90 días los almacenados a 4 °C reporto un porcentaje alto de sobrevivencia, entre un 85 % y 70 % con el medio M. Jackson y medio C. Rivas respectivamente.

Después de 90 días aun se observa la buena germinación, con el medio M. Jackson el cual presenta una ligera ventaja. Debido a la identificación de ciertas condiciones nutricionales que ayudan a la producción y sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo líquidos, favoreciendo la tolerancia a la desecación (Jackson *et al.*, 1997, 1999) y se podría dar el caso con medio M. Jackson de este trabajo, el cual contiene una serie de elementos, los cuales podrían contribuir.

Según Steinhaus, (1960) las conidias almacenadas entre 4 °C y 8 °C permanecen viables de 1 a 3 años, en tanto almacenadas a temperaturas mayores como 21 °C disminuyen su viabilidad en pocos meses; este dato concuerda con lo reportado por Sandoval-Coronado *et al.*, 2001 donde la composición del medio, los soportes del secado y la temperatura de almacenaje tiene un alto impacto en la sobrevivencia de las blastosporas. Y reporta que bajo las condiciones de obtención de blastosporas P*fr* 612, en matraces de 500 mL a 300 r.p.m en dos medios de cultivo (los mismos evaluados aquí), utilizando diversos soportes para su formulación, secado por el método de aire, y almacenados a dos diferentes condiciones, el medio M. Jackson (LM1) produce altas concentraciones de blastosporas que no solo sobreviven mejor al secado que las blastosporas producidas en medio C. Rivas (LM2) pero también mantiene la viabilidad a lo largo del almacenaje con las formulaciones y soportes probados por el (fécula de maíz, harina de arroz, talcos, una cal mexicana, una arcilla calcinada (Surround), tierra de diatomeas).

La naturaleza de un soporte secado mostró tener un significativo impacto en la estabilidad del almacenaje de todas las blastosporas particularmente aquellos producidos en LM1 bajo la producción, secado y almacenaje similar a las condiciones usadas en este, formulaciones almacenadas a 4 °C tiene mejor estabilidad de almacenaje en todas las formulaciones, que las blastosporas almacenadas a 28 °C. Se ha estimado en el caso de las conidias que necesitan permanecer viables al menos 7 semanas para ser utilizados como agente de control biológico (Clark *et al.*, 1968), considerando esta referencia la viabilidad de los productos recuperados en este trabajo superaría las perspectivas, por tener una germinación mayor del 50 % después de 5 meses de almacén, se logro empleando un método de separación por centrifugación y almacenados a 4 °C; Sin embargo Couch & Ignoffo (1981) sugieren que el tiempo de vida de un biopesticida debe ser de 12 a 18 meses, o 3 – 6 meses es requerido el patógeno para una aplicación en un tiempo especifico.

Por lo que mejorando las condiciones de secado y trabajando la humedad relativa de los productos, se puede impactar en la estabilidad de los formulados almacenados de las blastosporas de *P. fumosoroseus* en estudios posteriores.

Uno de los factores que más afecta a los hongos son las altas temperaturas, por esta razón al almacenarlos por mucho tiempo se recomienda mantenerlos en refrigeración (Monzón 2001), como se realizó, pero como se aprecia en la Figura 15, durante las primeras semanas se observo la disminución constante de la germinación, hasta perderla en un periodo muy corto (menos de 2 meses), además de comenzar a presentar descomposición de las células, así como la presencia de contaminación, debido al manipuleo constante de estos tratamientos (Debido al muestreo semanal realizado).

Dado este resultado las blastosporas de emplearse así para el control de *B. argentifolii*, se deberá considerar su utilización inmediatamente (después de su proceso de fermentación), para su actividad insecticida; por un periodo corto aun contiene su efectividad, como se demuestra en los bioensayos realizados. Monzón, (2001) por ejemplo: menciona que la viabilidad de las conidias se mantiene mayor tiempo en la formulación líquida que en la sólida. En el caso de Stathers *et al.*, (1993) hace notar que se deberá considerar el tipo de ingrediente activo a utilizar, ya sean conidias aéreas, conidias sumergidas y blastosporas porque todas ellas poseen diferente estabilidad, y las blastosporas las menos estables. Estos detalles se aprecian, en este trabajo donde las blastosporas permanecieron poco viables durante su seguimiento.

De esta forma queda plasmada la necesidad de utilizar un soporte (por ejemplo: tierra de diatomeas) porque es un material muy usados para elaborar formulados, y es considerada como una alternativa estable y no toxica. Sin embargo en cantidades grandes puede causar efectos adversos sobre las propiedades físicas de los granos cuando es usado en áreas cerradas. (Golob, 1997, Korunic, 1998). Debido a que actúa como desecante, la tierra de diatomeas es más efectiva a baja humedad (Moore *et al.*, 2000). Ayudando así a las blastosporas del hongo par mantener alta su viabilidad.

Existen reportes en donde muchos hongos bajo condiciones extremas, la espora provee la fuente de Carbono a utilizar (Bidochka *et al.*, 1990). Desde el punto de vista de la fuente de Nitrógeno, el incremento en la reserva endógena en cultivos limitados de N pueden incrementar la sobrevivencia durante el almacenamiento (Lane & Trinci 1991), en este trabajo la fuente de Nitrógeno proporcionada (Peptona, Casaaminoácidos) por ambos medios era muy rica, lo cual pudo influir como un factor para elevar el tiempo de sobrevivencia de las blastosporas, y mostró más efecto el medio con casaaminoácidos como fuente principal de Nitrógeno, se observo ligera ventaja sobre el otro medio de cultivo.

Sin embargo el soporte utilizado puede ser también muy importante para la viabilidad como se observa en la Figura 15 donde el porciento de germinación disminuyo drásticamente.

Montemayor, (2004) reporta. La implementación de varios soportes, para realizar pruebas de viabilidad con blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas a nivel matraz con los mismo medios de cultivo que nuestro trabajo y empleo diferentes soportes: tierra de diatomeas 5 %, almidón de maíz modificado (capsul) 20 %, pectina 2 % y gelatina 2 %; posteriormente realizó la filtración del producto con una bomba de vació y recuperado con papel Whatman N° 1. *P. fumosoroseus* con capsul, gelatina y pectina mostraron una estabilidad similar en los dos medios de estudio utilizados después del proceso de secado, mientras que con tierra de diatomeas una mayor estabilidad de sobrevivencia con su medio control (medio M. Jackson); a la vez de reportar baja viabilidad cuando las blastosporas contenían capsul; ya que el capsul es un polímero diseñado para el secado por aspersión, y este utilizo secado por aire a temperatura ambiente muestra resultados poco satisfactorios, sin embargo si consideramos otro método de secado para sobrevivencia de las blastosporas en un futuro se podría considerar hacer pruebas con en este polímero (capsul), usándolo para el cual esta diseñado.

Debido a los antecedentes mostrados anteriormente, se deberán considerar todos los factores que llevan a la elaboración de un bioinsecticida realmente efectivo, ya que este paso es importante para el éxito, el en el campo sobre la plaga a tratar, pues la sobrevivencia al proceso de desecación así como permanecer viables e infectivas durante un periodo de almacenamiento considerable seria el reto. Comenzando desde reformulando los medios de cultivo utilizados tratando que los nutrientes usados proporcionen mayor viabilidad, usando condiciones de agitación adecuadas que produzcan cantidades mayores del ingrediente activo (esporas) en un menor tiempo, economizando de esta forma el proceso, métodos de formulación y soportes inertes adecuados, para su sobrevivencia a la exposición de condiciones ambientales. Todo este conjunto de condiciones harán que el bioinsecticida producido, sea de gran utilidad y valor comercial para los agricultores.

7.2. DISCUSIÓN SOBRE LA EFECTIVIDAD BIOLÓGICA

Los resultados logrados con el medio C. Rivas de 80.52 % y el 76.3 % de mortalidad (por infección) a los dos días de la única aplicación puede ser un buen presagio, para lograr el éxito en el empleo de hongos entomopatógenos porque para ello se requieren de varios factores, destacando: 1) desarrollar la infección en los insectos, deberá haber una humedad relativa superior a 70 % con temperaturas entre 24 y 30 °C (Gallegos *et al.*, 2003) y se dieron las condiciones en este estudio 2) el hongo inicia la infección cuando la espora se pone en contacto con el cuerpo del insecto (Lezama *et al.*, 1997) en este caso la aplicación y los productos ayudaron a estar en contacto por lo tanto infecto más rápido. Estos factores también se pudieron dar en el producto comercial (Specifik®) con 72.44 %, se puede observar en la Tabla X.

Mortalidades más altas reporta McCoy, (1991) con concentraciones más bajas que las usadas en este trabajo, determino que las ninfas de la mosquita blanca son aniquiladas en concentraciones de 10^6 esporas/mL por el hongo *P. fumosoroseus*, causando mortalidades de 90 % a las 72 horas de haber sido aplicado el patógeno. Asimismo lo determina como un agente capaz de atacar todos los estados biológicos de la mosca blanca *B. tabaci*, concluyendo que este patógeno presenta un gran potencial como control microbial de la plaga.

Conclusiones similares reporta Lindquist, (1993) al evaluar una concentración de 10^8 esporas/mL aplicado sobre hojas de nochebuena infestadas con todos los estados de desarrollo de la mosquita blanca. Además menciona que el parasitoide Encarsia (enemigo natural) es inmune al hongo y la eficacia de este es estable, siempre y cuando se mantenga una humedad relativa superior a 80 %.

Nava *et al.*, (2001) mencionan que el control químico de mosquita blanca es difícil de lograr para diversas razones destacando su capacidad a desarrollar rápidamente resistencia a la mayoría de los grupos tóxicos de insecticidas. Cabe mencionar que en esta zona se tiene tiempo aplicando este producto químico, dándose esta posible resistencia. En el (2002), Guerrero realizó una evaluación de la efectividad de hongos entomopatógenos e insecticidas convencionales en el control de *B. argentifolii* en cultivos de melón, reportando de los diversos insecticidas empleados (entre ellos Endosulfan), el mejor fue el Pymetrozine (Plenum) logrando una reducción de la infestación en un 79.2 % y el resto de los insecticidas tuvieron densidades promedio de mosquita blanca estadísticamente iguales al testigo sin tratar.

Se podría pensar que la aplicación de la formulación líquida sería más efectiva, ya que cuenta con el ingrediente activo directo y sin ningún conservador, estudios recientes muestran lo contrario, la implementación de diversos protectores (adyuvantes) ayudan a la sobrevivencia de las blastosporas hasta estar en contacto con el insecto. Y este puede ser un factor importante para que la formulación líquida (Caldo de fermentación) no mostrara en ambos tratamientos (M. Jackson y C. Rivas) los resultados esperados.

Durante (1998) Jackson *et al.*, reportan los primeros resultados de efectividad con blastosporas y conidias aeriales de *P. fumosoroseus* contra el afido ruso del trigo, producidas en medio líquido usando el método descrito por Jackson *et al.*, 1997. Las suspensiones de hongos fueron atomizadas en los afidos sobre hojas de cebada fijas en una superficie de agar, inoculando 5 x 10^4 esporas/mL presentaron solo 57 % de micosis usando las blastosporas frescas, mientras que las blastosporas secadas por aire solo 44 %, las cuales comparándolos con los resultados observados durante el primer muestreo, están bajo los mismos rangos.

Con la formulación líquida (Caldo de fermentación), las tres dosis de muestran un rango de mortalidad (ninfas infectadas) entre 40 % y 55 %, presenta poca efectividad, considerando que se busca al aplicar los bioinsecticidas una alta infestación en un menor tiempo. Aun así los resultados logrados en este estudio muestran un porcentaje mayor de ninfas infectadas, que el reportado por Esquivel (2002), donde utilizó el producto comercial Pae-sin® (*P. fumosoroseus*) en condiciones de invernadero y bajo condiciones favorables (Temperatura 23 °C y Humedad relativa 75 %) para la infección del hongo, la dosis baja mostró efectividad solamente del 13.1 % de ninfas infectadas, también mencionan que la relación con el periodo de infección de ninfas se observo que es hasta 3 días después de la aplicación cuando aparecen los primeros efectos y posteriormente el grado de infectividad se incrementa, teniendo en cuenta este dato nuestro tratamiento mejora las perspectivas.

Al parecer la formulación líquida del medio C. Rivas, presenta un proceso de infección más rápido, Este comportamiento no se logra en la formulación en polvo, la cual empieza a perder efectividad en esta fecha, a pesar de que la dosis media al principio cuenta con un porcentaje alto. Fargues *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 1997 mencionan que bajo condiciones de campo, los requerimientos de humedad representan una significante constricción para la eficacia del biocontrol, la rápida germinación producida por blastosporas en cultivos líquidos debería aumentar la capacidad de estos propágalos para infectar y matar *B. argentifolii* y otros insectos plagas, pero no se observa este beneficio, por otro lado se pudo dar el factor que determino Thomas *et al.*, 1987, el cual las blastosporas tienen un corto tiempo de vida y poco sobreviven a condiciones adversas, que pueden llevar a baja efectividad de este tratamiento.

Osuna-Paéz (2003) realizó un trabajo con propágulos de cultivo sumergido, conidios aéreos, propágulos de cultivo sumergido más el caldo de fermentación, solo caldo de fermentación y un testigo absoluto, realizando 8 aplicaciones cada 4 días, donde los mejores resultados fueron los conidios aéreos (5 x 10^{13} conidios/ha) y los propágulos de cultivo sumergido más el caldo de fermentación (6 x 10^{11} propágulos/ha), sin diferencias significativamente. Al día 33 del experimento, los porcentajes de mortalidad totales producidos por los conidios aéreos y propágulos de cultivo sumergido (3 x 10^{11} propágulos /ha) fueron 83 ± 14 y 71 ± 22%, respectivamente, sin que hubiese diferencia significativa en los índices de infección.

Los propágulos de cultivo sumergido fueron tan virulentos contra las ninfas de mosquita blanca como sus conidios aéreos. Un efecto semejante se logra en este estudio; pero podría mejorar (incrementando él porcentaje de mortalidad) si se realizaran más aplicaciones de los productos, así como lograr conservar las condicione ideales de Humedad relativa y Temperatura los cuales son factores presentes en campo. El testigo biológico (Specifk®) muestra una reducción considerable de efectividad en el (2003) Soto tiene la misma tendencia de disminución al avanzar el tiempo de muestreo, pero sobre adultos de mosquita blanca en hojas de melón, donde el bioinsecticida comercial fue Pae-sin® (*P. fumosoroseus*) cuya composición cuenta con *P. fumosoroseus*, diluyentes y protectores solares (U.V.) después de dos aplicaciones reduce la densidad de adultos después de la primera aplicación, del 7.5 al 49.9 % con respecto a su testigo sin tratar. Debido a que Specifik® causa mortalidad en diferentes estadios de desarrollo del insecto, que se generan en un lapso de 48 a 72 h una vez que las esporas entren en contacto con el insecto, comienza a partir de las 72 h, y existiendo las condiciones óptimas de humedad, el fabricante recomienda varias aplicaciones, una segunda a partir de los 6 días después de su aplicación y las siguientes según la disminución de la plaga (www.naturalmentepuresa.com visitada en 2005). Esto pudo ser la causa de disminución y la perdida de efectividad tan rápida.

La mezcla de Endosulfan + Rescate 20 PS presenta 31.76 % de ninfas muertas al cuarto día, lo que indica la perdida de efectividad en contra de *B. argentifolii* sobre este cultivo (Tabla XI), como se menciono anteriormente la aplicación de insecticidas químicos provoca el desarrollo de poblaciones resistentes, debido a lo lento del proceso de infección que se da con los bioinsecticidas, y a los problemas que puede causar los productos químicos a pesar de actuar más rápido, se podría recomendar la unión de los dos productos como menciona Ávila-Valdez (2000) donde obtiene buenos resultados en el control *B. tabaci* sobre cultivos de tomate, al unir una dosis de Endosulfan (1.0 dosis/ha) + *B. bassiana* (Bea-sin®) (1.0 L/ha), obtiene valores aritméticos similares a los biológicos, mostrando que se puede utilizar el control químico combinado con un insecticida biológico con buenos resultados, con la ventaja de que se está disminuyendo el volumen de ingrediente activo del Endosulfan al 50 %.

En el control de mosquita blanca se reporta la utilización de conidios aéreos (Avilés,1995) como los propagulos de cultivo sumergido (Butt *et al.*, 1999; Wraight and Carruthers 1999; Wraight *et al.*, 2000); Mientras algunos autores como Fargues *et al.*, 1994 reportan las blastosporas de la cepa 32 de *P. fumosoroseus* aplicadas en dosis de 3 x 10^3 propagulos/cm^2 son más virulentas sobre *Spodoptera frugiperda* que los conidios; Por otro lado Vandenberg *et al.*, 1998 reportaron sin diferencias significativas la virulencia de los conidios aéreos y blastosporas, en bioensayos realizados en laboratorio con las cepas 4461, 4491, 4501 y 612 de *P. fumosoroseus*, aplicando dosis de 5 mL con 5 x 10^4 propágulos/mL sobre adultos de *Diaraphis noxia* Mordvilko.

Lacey *et al.*, 1999 no encontraron diferencias significativas en la virulencia de blastosporas y conidios aéreos de la cepa Pfr-42, que produjeron mortalidades de 68 y 59 %, respectivamente, aplicando 3.8 x 10^3 propágulos/cm^2 sobre ninfas de *B. argentifolii* (Bellows & Perring); sin embargo, bajo condiciones similares, estos autores encontraron que las blastosporas de la cepa Pfr97 fueron significativamente más virulentas que sus conidios aéreos, reportando mortalidades de 77 y 27 % respectivamente.

P. fumosoroseus ha tenido gran aceptación dentro de la investigación diversos estudios reportan la efectividad de este hongo solo, o en combinación con otros elementos. Un ejemplo será el uso de *P. fumosoroseus* a partir de cepas nativas donde se reporta hasta un 70 % de control en poblaciones de mosca blanca de invernadero (Sánchez, 1997), así como en bioensayos, con mortalidades del 50 al 80% (Carruthers *et al.*, 1993) su mayor aplicación, sin embargo ha sido como formulados comerciales, con porcentajes de control hasta del 90 % tanto en ninfas de invernadero (Pérez *et al.*, 1999) como en poblaciones de campo donde su uso tiende a incrementarse (Gutiérrez *et al.*, 1996).

De acuerdo al historial de aplicación química contra la mosquita blanca los primeros tóxicos usados fueron cianuro de sodio y el cianuro de calcio (Morrill, 1905; Weigwl, 1925). Posteriormente Holdway, (1945) reporto como efectivos el DDT a dosis de 20 % y la emulsión de aceite blanco comercial, Wilson, (1946) utilizo aspersiones de DDT al 0.1 % y encontró que el insecticida fue efectivo contra todos los estados inmaduros del insecto. Duarte menciona en (1956), que la mosquita blanca era susceptible a los insecticidas organoclorados y organofosforados, por lo que recomendó hacer espolvoreos con una mezcla de insecticidas DDT al 10 % con Paratión metílico al 2 % o este último más Toxafeno al 20 %. En lo que se refiere a la zona algodonera del Soconusco Chiapas, el control de la mosquita blanca se realizaba con Paratión etílico, pero después se efectuó un ensayo en el ciclo 1969-1970, resultando más prometedores el Carbaril, Fosfolán, Monocrotofos, Naled y Oxidemeton metílico (Espinosa, 1970).

Si se toma en cuenta este historial no debería sorprendernos los resultados obtenidos, por la poca efectividad del Endosulfan + Rescate 20 PS, donde al tercer muestreo (Tabla XII) después de seis días de la aplicación logra 42.04 % de mortalidad; Además se ha estimado que a nivel mundial el desarrollo de plagas resistentes a pesticidas ha ido en aumento y en la actualidad se tienen aproximadamente mil especies de organismos plaga que son inmunes a plaguicidas químicos (Wood *et al.*, 2000).

Otro factor de la poca efectividad del Endosulfan pudo haberse dado según Pacheco 1990 citado por Nava *et al.*, 2001 por lo siguiente; 1) Tanto los estadios inmaduros como los adultos se localizan en el envés de la hoja, encontrándose bien protegidos de las aplicaciones convencionales, 2) los estados inmaduros son sésiles (excepto el primer instar durante un periodo de tiempo corto), moviéndose alrededor de la planta y no incrementan su exposición a los tóxicos, 3) el aumento de tolerancia a los insecticidas por las ninfas grandes (susceptibilidad diferencial), 4) Y sobre todo la capacidad de las mosquitas blancas de desarrollar rápidamente resistencia a la mayoría de los grupos toxicológicos de insecticida; señalado anteriormente.

Si se toma en cuenta el ciclo biológico de *B. argentifolii* que se alcanza en un rango de 18 a 31 días; bajo las mismas condiciones de hospedero y temperatura de desarrollo (Bethke, 1991). Y se compara con nuestros resultados, se deberá resaltar que al final de estudio solo se llevo acabo en un periodo de 8 días, en los cuales se logro reducir la población de mosquita blanca, por consiguiente se podrá tener un control total al utilizar los mejores tratamientos de este, debido a que *P. fumosoroseus* cepa 612 solo tarda entre 48 y 72 h en germinar, como se observo desde la primera fecha de muestreo después de 48 h de su aplicación apareciendo los valores altos de infección, de esta forma se consigue reducir su ciclo biológico.