

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**PRODUCCION EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO  
Y SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS DE  
*Paecilomyces Fumosoroseus* (Wize) Brown  
& Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes),**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA:**

**M.C. ISELA QUINTERO ZAPATA**

**MONTERREY, N. L. MEXICO,**

**NOVIEMBRE 2001**

TD  
SB975  
.Q55  
2001  
c.1



1080124445



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INDUCCIÓN EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO  
Y SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS DE  
*Penicillium Penicillium* (Wize) Brown  
& Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

M.C. ISELA QUINTERO ZAPATA

MONTERREY, N. L. MEXICO,

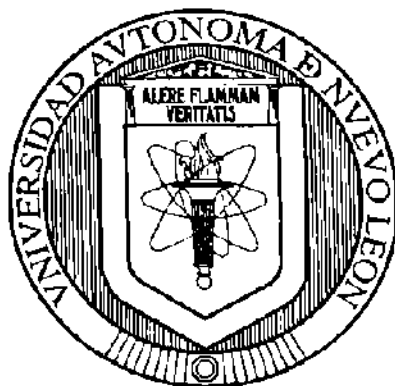
NOVIEMBRE 2001



TD  
SB975  
- Q5  
201



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PRODUCCION EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y  
SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*  
(Wize) Brown & Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA  
M.C. ISELA QUINTERO ZAPATA

Monterrey, N.L., México

Noviembre 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO


PRODUCCION EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y  
SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*  
(Wize) Brown & Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA  
M.C. ISELA QUINTERO ZAPATA

APROBADA:  
COMISION DE TESIS

Dr. Luis J. Galán Wong  
Presidente (Director)



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Secretario (Codirector)



---

Dra. Catalina Rivas Morales  
Vocal (Codirector)



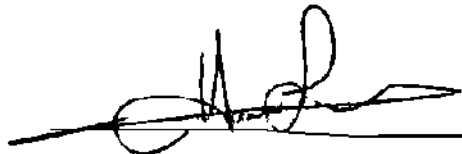
---

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
Vocal



---

Dr. Hugo A. Luna Olvera  
Vocal



---

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

PRODUCCION EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y  
SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS DE *Paecilomyces fumosoroseus*  
(Wize) Brown & Smith (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA  
M.C. ISELA QUINTERO ZAPATA

Dr. Luis J. Galán Wong  
Director de Tesis

Dr. Mark Jackson  
Director Externo

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Secretario (Co-director)

Dra. Catalina Rivas Morales  
Vocal (Codirector)

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
Vocal

Dr. Hugo A. Luna Olvera  
Vocal



Este trabajo se realizó en la Planta de Fermentación del Laboratorio de Microbiología Industrial y del suelo, del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la Asesoría del Dr. Luis J. Galán Wong y en el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS) bajo la Asesoría del Dr. Mark Jackson.

## DEDICATORIA

A *Dios*, por permitirme culminar esta meta.

A *Iselita y Alejandra*, el regalo más hermoso que me ha dado la vida,  
por darme tanta felicidad y gracias por comprenderme.

A *Juan José*, por tu amor, por comprenderme y darme tu apoyo.

A *Tita*, gracias por darme la vida, por que sin ti, no hubiera sido posible esta  
tarea, gracias por todo tu apoyo.

A todos mis familiares, con mucho cariño y agradecimiento.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León,  
por el apoyo brindado en los Programas:  
“Apoyo de Tesis de Postgrado 2001” y  
“Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica”  
(PAICYT) 1999.

y

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
por la beca otorgada (No. 90070) para la realización del Doctorado,  
inscrito en el Padrón de Postgrados de Excelencia.

## AGRADECIMIENTOS

A la Planta de Fermentación del Departamento de Microbiología e Inmunología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., por las facilidades otorgadas para la realización de esta Tesis.

Al USDA-ARS de Peoria, Illinois por habernos entrenado en esta Línea de Investigación, relacionada con la producción de hongos entomopatógenos y por todas las facilidades otorgadas.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por todo el apoyo y asesoría de esta investigación, así como por las facilidades otorgadas para mis estudios.

Al Dr. Mark Jackson, por la entrenamiento recibido en su Institución, sugerencias para este trabajo y facilidades otorgadas.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño, por todo el apoyo y sugerencias en este Proyecto de Investigación.

A la Dra. Catalina Rivas Morales, por su apoyo y sugerencias en la revisión del escrito, y por su participación en el comité de exámen.

A la Dra. Lilia H. Morales Ramos, por las facilidades otorgadas y sugerencias en este trabajo de investigación, y por su participación en el comité de exámen.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera, por su apoyo en elaboración de las gráficas y sugerencias y por su participación como miembro del comité de exámen.

A la Q.B.P. Karina Villanueva Treviño y Q.B.P. Deyanira Flores Gutiérrez, por su valiosa participación en este proyecto y por su amistad, gracias.

A la M.C. Lucía Leticia Palacios Cortez, y a la Q.B.P. Beatriz E. Gómez Martínez, por haber compartido sus conocimientos de fermentaciones en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Roberto Mercado Hernández, Dr. Carlos Sandoval y Q.F.B. Manuel Leos Leos, por su valiosa colaboración en este trabajo de investigación.

A la M.C. Irma Olivia Martínez Vazquez, por todo su apoyo durante mi carrera y por su gran amistad.

A la Ing. Myriam Elías Santos, por gran su apoyo y amistad.

Agradezco a las estudiantes: **Mónica, Selvia, Claudia Nohemí y Rosa María** por su gran apoyo en este proyecto e interés dentro de este laboratorio. Y en general a todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

## INDICE GENERAL

|   | Pág      |
|---|----------|
| INDICE                                  | A        |
| LISTA DE TABLAS                         | i        |
| LISTA DE FIGURAS                        | ii       |
| RESUMEN                                 | iv       |
| ABSTRACT                                | v        |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                  | <b>1</b> |
| 1.1. Antecedentes                       | 2        |
| 1.1.1. <i>Bemisia tabaci</i>            | 2        |
| 1.1.2. Control biológico                | 3        |
| 1.1.3. Hongos entomopatógenos           | 4        |
| 1.1.3.1. Importancia                    | 4        |
| 1.1.3.2. Morfología y crecimiento       | 6        |
| 1.1.3.3. Etapas de Infección            | 6        |
| 1.1.3.4. Biotecnología de producción    | 9        |
| 1.1.3.4.1. Selección del organismo      | 10       |
| 1.1.3.4.2. Selección del propágulo      | 12       |
| 1.1.3.4.3. Requerimientos nutricionales | 14       |
| 1.1.3.4.4. Producción de biomasa        | 15       |
| 1.1.3.4.5. Recuperación                 | 17       |
| 1.1.3.4.6. Formulaciones                | 17       |
| 1.1.3.5. Algunos productos comerciales  | 18       |
| 1.1.3.6. Diseño de medios de cultivo    | 21       |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.1.4. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>  | 26        |
| 1.1.4.1. Distribución  | 26        |
| 1.1.4.2. Morfología  | 26        |
| 1.1.4.3. Modo de acción  | 27        |
| 1.1.4.4. Rango de hospedero  | 27        |
| 1.1.4.5. Producción de blastosporas  | 28        |
| 1.2. Hipótesis   | 30        |
| 1.3. Objetivo general  | 31        |
| 1.3.1. Objetivos específicos   | 31        |
| <b>2. MATERIAL Y METODOS</b>   | <b>32</b> |
| 2.1. Obtención y conservación del material biológico   | 32        |
| 2.2. Medios de cultivo   | 32        |
| 2.2.1. Diseño de medios de cultivo con diferente<br>concentración de sacarosa                                | 33        |
| 2.2.2. Diseño de medios de cultivo con diferentes<br>concentraciones de harina de soya                       | 33        |
| 2.2.3. Diseño de medios de cultivo con dos concentraciones<br>de sacarosa y peptona como fuente de nitrógeno | 33        |
| 2.3. Experimentos realizados a nivel matraz  | 35        |
| 2.3.1. Activación de la cepa   | 35        |
| 2.3.2. Preparación del inóculo   | 35        |
| 2.3.3. Producción de blastosporas  | 36        |
| 2.3.3.1 Cuenta de blastosporas   | 36        |
| 2.4. Recuperación de las blastosporas  | 37        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.1 Viabilidad   | 37        |
| 2.5. Bioensayos preliminares en dieta artificial   | 38        |
| 2.6. Experimentos a nivel fermentador  | 39        |
| 2.6.1 Activación de la cepa  | 39        |
| 2.6.2 Preparación del inóculo  | 39        |
| 2.6.3 Producción de blastosporas   | 39        |
| 2.6.4 Condiciones de fermentación  | 39        |
| 2.6.4.1 Cuenta de blastosporas   | 40        |
| 2.6.4.2 Medición de pH   | 40        |
| 2.7 Recuperación de las blastosporas   | 40        |
| 2.7.1 Viabilidad   | 40        |
| <b>3. RESULTADOS</b>   | <b>41</b> |
| 3.1. Nivel matraz  | 41        |
| 3.1.1. Medios de cultivo con diferente concentración de<br>sacarosa  | 41        |
| 3.1.1.1. Concentración de blastosporas   | 41        |
| 3.1.1.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas   | 43        |
| 3.1.2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de<br>harina de soya                                   | 46        |
| 3.1.2.1. Concentración de blastosporas   | 46        |
| 3.1.2.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas   | 46        |
| 3.1.3. Medios de cultivo con dos concentraciones de sacarosa<br>y peptona de colágena como fuente de nitrógeno | 51        |
| 3.1.3.1. Concentración de blastosporas   | 51        |



|   |    |
|---|----|
| 3.1.3.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas                        | 51 |
| 3.2. Bioensayos preliminares contra lepidópteros                              | 55 |
| 3.3. Producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> a nivel fermentador | 57 |
| 3.3.1. Concentración de blastosporas  | 57 |
| 3.3.2. Consumo de oxígeno   | 59 |
| 3.3.3. Viabilidad de las blastosporas   | 59 |
| 4. DISCUSIÓN  | 64 |
| 5. CONCLUSIONES   | 73 |
| 6. RECOMENDACIONES  | 74 |
| 7. BIBLIOGRAFIA   | 75 |
| 8. ABREVIATURAS Y SIMBOLOS  | 88 |
| 9. APENDICE   | 89 |

## LISTA DE TABLAS

| Tabla No. | Título   | Pag |
|-----------|--|-----|
| 1         | Insectos susceptibles de control con hongos entomopatógenos  | 5   |
| 2         | Formulados a partir de hongos entomopatógenos en investigación y desarrollo  | 12  |
| 3         | Productos comerciales basados en hongos entomopatógenos  | 13  |
| 4         | Ingredientes de medios de cultivo para la producción de insecticidas microbianos   | 16  |
| 5         | Comparación de los medios de cultivo estudiados  | 34  |
| 6         | Componentes del medio basal  | 35  |
| 7         | Germinación de las blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidos en medios de cultivo a diferente concentración de sacarosa y harina de soya | 45  |
| 8         | Germinación de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en medios de cultivo a diferente concentración de harina de soya                | 50  |
| 9         | Sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> en medios de cultivo con dos concentraciones de sacarosa                                 | 54  |
| 10        | Producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> a nivel fermentador a dos condiciones de agitación  | 58  |
| 11        | Sobrevivencia de extractos de <i>P. fumosoroseus</i> producidos a nivel fermentador y almacenados a 4° C   | 60  |
| 12        | Sobrevivencia de extractos de <i>P. fumosoroseus</i> producidos a nivel fermentador y almacenados a temperatura ambiente                         | 60  |

## LISTA DE FIGURAS

| Figura No. | Título   | Pág. |
|------------|--|------|
| 1          | Distribución mundial de la mosca blanca ( <i>B. tabaci</i> )   | 3    |
| 2          | Proceso para la producción de hongos entomopatógenos   | 21   |
| 3          | Producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> en medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa y harina de soya   | 42   |
| 4          | Comparación de los medios de cultivo a base de diferente concentración de sacarosa y harina de soya en la germinación de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> .              | 43   |
| 5          | Sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en los medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa y harina de soya                           | 44   |
| 6          | Producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> en medios de cultivo con diferente concentración de harina de soya  | 47   |
| 7          | Comparación de los medios de cultivo a base de diferente concentración de harina de soya, en la germinación de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> .                        | 48   |
| 8          | Sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en medios de cultivo con diferente concentración de harina de soya  | 49   |
| 9          | Producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> en medios de cultivo con sacarosa y peptona de colágena.  | 52   |
| 10         | Sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en dos concentraciones de sacarosa  | 53   |
| 11         | Mortalidad de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> a dos concentraciones contra (A) <i>H. virescens</i> , (B) <i>S. exigua</i> , (C) <i>T. ni</i> y (D) <i>D. sacharalis</i> | 56   |
| 12         | Efecto de la agitación y aireación sobre la producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i>   | 58   |
| 13         | Efecto de la agitación y aireación sobre el consumo de oxígeno en la producción de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> a 250 y 400 r.p.m.                                   | 61   |

|    |  |    |
|----|--|----|
| 14 | Comparación de velocidad de agitación y almacenamiento en la sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas a nivel fermentador. | 62 |
| 15 | Sobrevivencia de blastosporas de <i>P. fumosoroseus</i> producidas en dos condiciones de agitación y almacenamiento                                  | 63 |

## RESUMEN

Los requerimientos nutricionales de los hongos entomopatógenos han sido escasamente estudiados a pesar de que esta información es esencial para la producción de biomasa a nivel industrial para su consiguiente éxito comercial, este conocimiento puede permitir la simplificación del medio de cultivo y disminuir los costos sin afectar la producción de blastosporas. La producción masiva de *P. fumosoroseus* se basa en técnicas de fermentación difásica; que combina las ventajas del medio sólido y líquido, sin embargo la preocupación radica en encontrar sistemas de producción que le permitan al hongo mantenerse por más tiempo en anaquel. En el presente trabajo se evaluaron 11 diferentes medios de cultivo a base de sacarosa como fuente de carbono y harina de soya (A-1, A-2, A-3 y A-4; B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5) o peptona de colágena (C-1 y C-2) como fuente de nitrógeno, para mejorar substancialmente la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus*. Se utilizó la cepa 612 de *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^6$  blastosporas/mL) como inóculo a matraces bafleados y Microfermentador. La biomasa se secó por aire con tierra de diatomeas (5 % w/v) y a los productos obtenidos se les determinaron pruebas de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo. Las concentraciones de sacarosa que produjeron mayores rendimientos en la producción de blastosporas a nivel matraz respecto al resto de los medios de cultivo fueron: medio B-1 (8.0 %) y 3.8 % de harina de soya produjeron  $1.12 \times 10^9$  blastosporas/mL y el medio C-1 (2.0 %) y 4.5 % de peptona de colágena con una producción de  $9.5 \times 10^9$  blastosporas/mL. Después de determinar el medio de cultivo óptimo C-1 a nivel matraz, este se seleccionó para la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en fermentadores de 5 L. Se probaron dos condiciones de agitación (400 r.p.m.–1.5 v.v.m. y 250 r.p.m.–1.0 v.v.m.) y se encontró que la mejor producción fue de  $1.45 \times 10^8$  blastosporas/mL a 400 r.p.m.- 1.5 v.v.m. en 30 horas de fermentación. Las blastosporas de *P. fumosoroseus* que mostraron mayor porcentaje de sobrevivencia fueron cultivadas a nivel matraz y sobrevivieron durante 6 meses, y a nivel fermentador a velocidad de agitación de 400 r.p.m. sobrevivieron durante 2 meses, ambos extractos fueron almacenadas a 4 °C. De acuerdo a los datos obtenidos se concluye que el medio de cultivo utilizado con peptona de colágena representa una alternativa mejor para la producción de *P. fumosoroseus* debido a la estabilidad de almacenaje y producción.

## ABSTRACT

The nutritional requirements of entomopathogenic fungus has been less studied, but this information is essential for biomass production at industrial levels and it's commercial successful, this knowledge can permit culture medium simplification and diminish cost without affect blastospores production. The massive production of *P. fumosoroseus* is based in diphasic fermentation technics. They combine the advantages of solid and liquid medium, nevertheless the main point is to find production systems that allow the fungus to live longer in store. This work has evaluated eleven different culture media with sacarose as carbon source, soy flour (A-1, A-2, A-3 y A-4; B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5) or peptona from collagen (C-1 y C-2) as nitrogen source to make better the blastospores production in *P. fumosoroseus*. It was used 612 of *P. fumosoroseus* ( $1 \times 10^6$  blastospores/mL) to inoculate the baffled flasks and microfermentor. Biomass was mixed with diatomeas earth (5% w/v) and air dried to determine viability tests at different periods of time. The sacarose concentrations with best production of blastospores at flasks level versus others culture media were: the medium B-1 (8 %) and soy flour at 3.8 %, produced  $1.12 \times 10^9$  blastospores/mL; the medium C-1 (2.0 %) and peptona from collagen at 4.5%, produced  $9.5 \times 10^9$  blastospores/mL. After determine C-1 culture medium as optimus at matrass level, it was selected for blastospores production *P. fumosoroseus* in 5L fermentator. Two agitation conditions were proved 400 r.p.m.-1.5 v.v.m. and 250 r.p.m.-1.0 v.v.m., we found that the best production was  $1.45 \times 10^8$  blastospores/mL at 400 r.p.m. in 30 hours fermentation. The *P. fumosoroseus* blastospores that shown better percent of survival at matrass level were cultured in C-1 medium, and they survive during six months. Whereas the blastospores produced at fermentator level and 400 r.p.m. survive during two months when both extracts were kepted at 4°C. Acording with the obtained data it was concluded that the peptona medium used shown better alternative produce *P. fumosoroseus* because its store stability and production.

## 1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de más y mejores alimentos y alta calidad de salud de la sociedad humana, ocasionó un incremento en el uso de compuestos químicos para el control de insectos de importancias agrícola, forestal y salud pública. (Feng *et al.*, 1994). Por lo cual se involucró el uso de organismos naturales o modificados genéricamente, genes o sus productos para reducir el efecto nocivo de organismos plaga, término conocido como "control biológico". (Gabriel y Cook, 1990) Entre los organismos utilizados en el biocontrol sobresalen los entomopatógenos, especialmente bacterias, virus y hongos. La desición del entomopatógeno depende de: ecología del patógeno y su blanco; accesibilidad del agente de control a la plaga; conocimiento básico del modo de acción y disponibilidad de tecnologías de producción, formulación y aplicación del entomopatógeno. (Khachatiurians, 1986; Samson *et al.*, 1988b; Lisansky, 1989)

La producción masiva de *P. fumosoroseus* se basa en técnicas de fermentación bifásica; que combina las ventajas del medio sólido y líquido, que permite crecer al hongo a su fase logarítmica para una producción máxima de biomasa micelial en fermentadores y posteriormente ser transferido a sustratos nutritivos para la producción de las conidias aéreas que es la forma de inoculo natural. (Soper y Ward, 1981)

La producción bifásica ha generado un gran cúmulo de conocimiento sobre los aspectos biotecnológicos de producción, sin embargo el futuro de la producción masiva radica en diseñar métodos de producción en una sola fase, la fermentación líquida. Este proceso posee varias ventajas, como son: cultivos 100% puros, condiciones de cultivo más controladas y mayor producción de esporas. Una de las principales limitantes biotecnológicas 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 más eficientes, que le permitan al hongo mantenerse por más tiempo en anaquel. (Badii, *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1997)

La importancia de este trabajo se basa en la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo líquidos, accesibles y de bajo costo para incrementar la sobrevivencia.

## 1.1 ANTEDECENTES

### 1.1.1. *Bemisia tabaci*.

Actualmente es uno de los insectos plaga que causan mayores pérdidas a la agricultura, principalmente a cultivos básicos y de hortalizas en nuestro país. Se conocen diferentes especies comúnmente llamadas "mosca blanca" y las más perjudiciales son *B. tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*. *B. tabaci*, es una plaga polífaga de distribución amplia adaptada a climas tropicales y templados del mundo (Figura No. 1).

La mosca blanca es muy importante ya que ataca más de 500 especies de cultivos agrícolas importantes, principalmente hortalizas, oleaginosas, ornamentales y frutales, esto debido a su alta tasa reproductora y a la resistencia a insecticidas. Son importantes porque transmiten enfermedades virales (principalmente geminivirus), tales como: masaico dorado del frijol, chino del tomate, virus dorado de la papa, enchinamiento de la calabaza, enchinamiento de la sandía, virus de la hoja enrollada del algodón, virus atigrado del chile, virus dorado del chile y virus dorado de la lechuga. Los daños ocasionados por *B. tabaci* se presentan al succionar la savia del floema de las plantas, provocando la muerte cuando las densidades poblacionales son muy altas. *Aschersonia aleyrodis*, *V. lecanii* y *P. fumosoroseus* son hongos reportados contra la mosca blanca bajo condiciones de invernadero. Mientras que comercialmente *P. fumosoroseus* y *B. bassiana* se están desarrollando para



el control de *B. argentifolii*. (Landa et al., 1994; Osborne and Landa, 1992; Smith, 1993)

el cual se estima es de 7,800 millones de dólares. En 1993 las



Figura No. 1. Distribución mundial de la mosca blanca (*B. tabaci*).

### 1.1.2. Control biológico.

Desde hace más 1700 años el control biológico de insectos de importancia agrícola se realiza en el lejano Oriente, mientras que en Europa y Estados Unidos de Norteamérica se practica 100 años atrás. (Frost and Sullivan, 1990)

El control biológico involucra el uso de organismos naturales o modificados genéticamente, genes o sus productos para reducir los efectos de organismos plaga. (Gabriel y Cook, 1990)

Los bioinsecticidas en particular ocupan el 5% del mercado total de insecticidas, el cual se estima es de 7,800 millones de dólares. En 1993 las ventas de productos biotecnológicos para uso agrícola en Estados Unidos ascendieron a 108 millones de dólares, de estos los bioinsecticidas representaron un 94%. (Tilton, 1993; Lorence, 1996)

El empleo de microorganismos como insecticidas biológicos (bacterias, hongos y virus) ha tomado tal relevancia que en la actualidad, en diferentes países ya se emplean productos comerciales elaborados a base de estos. Se conocen más de 100,000 especies de microorganismos con potencial microbiano hacia poblaciones de insectos plaga en diferentes sectores: agrícola, forestal, de ornamentales y de salud. Dentro de estas especies se encuentran diferentes tipos de microorganismos, que incluyen 750 de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y aproximadamente 100 de bacterias. (Ignoffó e Hink, 1971; Rodríguez *et al.*, 1991)

### **1.1.3. Hongos Entomopatógenos.**

#### **1.1.3.1. Importancia.**

Los hongos parásitos de insectos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son un factor que puede limitar la población de una especie de insectos. La epizootia es atribuida a la humedad ambiental y a una excesiva población de insectos. (Castillo, 1987) Dentro de los hongos entomopatógenos

(750), hasta el momento se han registrado para uso comercial los siguientes géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Entomocela*, *Verticillium* y *Hirsutella*, siendo el primero el más estudiado. Los factores que han impulsado su desarrollo son la seguridad que ofrecen al hombre, el aumento desmedido de la contaminación de los suelos, agua o medio ambiente en general y la importancia que ha adquirido el concepto de "manejo integrado de plagas". Los hongos entomopatógenos atacan un amplio rango de insectos comparado con otros microorganismos; así podemos encontrar desde mosquitos (díptera), áfidos (homoptera), chinches (hemíptera), etc. (Tabla No. 1). (Valenzuela, 1987; Deacon, 1984; Feng *et al.*, 1994)

Tabla No. 1. Insectos susceptibles de control con hongos entomopatógenos.

| Género de hongo      | Estado infectivo | Insectos susceptibles  |
|----------------------|------------------|--|
| <i>Coelomomyces</i>  | Zoosporas        | Mosquitos  |
| <i>Lagenidium</i>    | Zoosporas        | Mosquitos  |
| <i>Leptolegnia</i>   | Zoosporas        | Mosquitos  |
| <i>Conidiobulus</i>  | Conidia          | Afidos   |
| <i>Entomophaga</i>   | Conidia          | Chapulines y gusanos   |
| <i>Zoophthora</i>    | Conidia          | Afidos, gusanos y escarabajos                                |
| <i>Beauveria</i>     | Conidia          | Escarabajos, gusanos y pulgas saltonas                       |
| <i>Culicinomyces</i> | Conidia          | Mosquitos  |
| <i>Hirsutella</i>    | Conidia          | Acaros y saltamontes   |
| <i>Metarhizium</i>   | Conidia          | Pulgas saltonas, mosquitos, escarabajos y chinches apestosas |
| <i>Paecilomyces</i>  | Conidia          | Defoliadores y gusanos                                       |
| <i>Tohyopcladium</i> | Conidia          | Mosquitos  |
| <i>Verticillium</i>  | Conidia          | Afidos, mosquitas blancas, trips y escamas                   |
| <i>Nomuraea</i>      | Conidia          | Gusanos defoliadores   |

Adaptada de Valenzuela, L. E. 1987 y Donald, W.R.

### 1.1.3.2. Morfología y Crecimiento.

Los hongos entomopatógenos se encuentran clasificados dentro de la subdivisión Deuteromycotina, hongos imperfectos que raramente producen estado sexual. Los géneros de este grupo se distinguen por estructuras llamadas conidióforos, las cuales producen esporas que diferencian las especies de hongos considerando el tamaño y la forma. Los hongos no son tan exigentes, respecto a requerimientos nutricionales ya que pueden crecer con facilidad en medios comunes, tales como agar papa dextrosa, agar extracto de malta o agar saboraud dextrosa. En cultivos líquidos producen blastosporas (células semejantes a levaduras), mientras que en cultivos sólidos crecen como hifas elongadas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 25°C, pero no se desarrollan si es de 37°C. La humedad es un factor que favorece la producción de esporas asexuales en un cultivo. (Deacon, 1984)

### 1.1.3.3. Etapas de infección.

Los hongos entomopatógenos, como la mayoría de los hongos patógenos de plantas y vertebrados, infectan su hospedero penetrando por la cutícula externa. Este modo de infección es único y característico de los hongos ya que todos los microorganismos entomopatógenos incluyendo bacterias y virus, penetran su hospedero por ingestión vía intestino medio. Este proceso de micosis de un insecto consta de las siguientes etapas: a) adherencia de la spora fúngica a la cutícula del insecto, b) germinación y diferenciación de la spora, c) penetración del integumento del insecto por medio del tubo

germinativo y d) desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto, generalmente da por resultado la muerte del hospedero infectado. (Samson, *et al.*, 1988) Se ha estudiado con mayor detalle en *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. (Lorence, 1996)

a). Adherencia de la espora fúngica a la cutícula del insecto. Este proceso de adherencia de las esporas de los Deuteromycetos a la cutícula del hospedero es inespecífico. El contacto entre la espora fúngica y el hospedero es un requisito para el establecimiento de la micosis. La mayoría de los hongos entomopatógenos que producen esporas las dispersan por el viento y ocurre un contacto al azar entre la espora fúngica y la epicutícula del hospedero; el éxito de la micosis depende de las condiciones climáticas, cantidad de inóculo fúngico y densidad del hospedero. (Boucias y Pendlann, 1991; Samson, *et al.*, 1988a)

b). Germinación y diferenciación de la espora. Para que la germinación de la espora sea exitosa depende en gran medida de la accesibilidad que estas tengan a los nutrientes que se encuentren en ese ambiente. La fase de germinación se considera un paso crítico en el establecimiento de la infección y la determinación de la patogenicidad del hongo. Una vez que la espora se une al insecto germina, se forma el tubo germinativo, que penetrará a la cutícula del hospedero y que además sirve como penetrante de la hifa. Las esporas germinadoras de muchas especies entomopatógenas

tales como, *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *C. psorophorae* y *Neozygites fresenii*, producen una célula apresorial. (Samson, et al., 1988a) La germinación de las esporas depende de factores ambientales, especialmente humedades relativas superiores al 90%, temperatura promedio y presencia o ausencia de factores nutricionales (por ejemplo la ausencia de nutrientes disminuye la germinación de las conidias).

- c). Penetración del integumento del insecto por medio del tubo germinativo. El éxito de la germinación en la cutícula del hospedero no en todos los casos produce infección. La llegada de los elementos fúngicos hacia dentro del cuerpo del insecto es un requisito para la infección, esto depende de la habilidad de los tubos germinativos para penetrar la epicutícula externa y la procutícula interna. La epicutícula representa la barrera principal hacia la infección fúngica, es muy dura y delgada y se ha sabido que algunos insectos se hacen susceptibles a patógenos fúngicos débiles tales como *Mucor* y *Fusarium*. La procutícula, es la parte principal del integumento, está compuesta de quitina embebida en una matriz de proteínas fibrosas. (Samson, et al., 1988a) Para facilitar su penetración el hongo produce algunas enzimas que degradan la capa externa de la cutícula (epicutícula). Para degradar las capas siguientes el hongo produce diversas proteasas; la más activa de ellas es una proteína básica de 28.6 KDa llamada PR-1. La acción de PR-1 sobre las proteínas que componen las capas internas de la cutícula libera pequeños fragmentos (péptidos) de aproximadamente 5

aminoácidos de longitud. Para que éstos aminoácidos puedan ser utilizados como nutrientes por el hongo se necesita la acción de otro tipo de proteasas, principalmente aminopeptidasas y carboxipeptidasas. (Lorence, 1996)

d). Desarrollo del hongo dentro del cuerpo del insecto. Una vez que los hongos llegan a la hemolinfa del insecto producen enzimas tipo glicosidasas que les permiten capturar nutrientes y degradar los tejidos del insecto; dichas enzimas han sido confundidos con toxinas. (Charnley, 1994) Otra manera de que el hongo reaccione a la defensa del insecto es mediante la multiplicación de inóculos infectivos; la mayoría de los hongos entomopatógenos son capaces de formar levaduras que rápidamente son diseminadas en la sangre y hacen difícil la circulación de los hemocitos. Después el hongo crece hacia fuera del integumento y desarrolla estructuras conidiógenas bajo condiciones ambientales favorables y bajo condiciones desfavorables los hongos producen propágulos en reposo que le permiten mantenerse en condiciones adversas en ausencia de un hospedero. (Samson, R. A. *et al.*, 1988a)

#### 1.1.3.4. Biotecnología de Producción.

Durante los últimos 15 años el interés de los Micoinsecticidas ha llevado a la producción a gran escala de muchos candidatos fúngicos prometedores y a la comercialización (Tabla No. 2 y No. 3). A pesar de los desarrollos, existe

poca información disponible sobre la biotecnología de los hongos entomopatógenos y su producción a nivel industrial. Esta limitante puede deberse a varios factores, como pueden ser que la cepa elegida perdiese patogenicidad (virulencia) al nivel de campo o bien que la producción de esporas (conidias) sea insuficiente o muy tardado. La pérdida de virulencia se ha visto en cepas que han sido sembradas continuamente, el proceso de tal pérdida pudiese deberse a recombinaciones durante el ciclo parasexual. Existen requerimientos específicos para la producción comercial y aplicación de un entomopatógeno:

- a). La cepa seleccionada debe crecer rápida y abundantemente.
- b). Alta patogenicidad.
- c). Debe crecer en medios baratos.
- d). El producto formulado debe ser accesible al insecto y que perdure por prolongados periodos de tiempo a temperatura ambiente sin disminuir la actividad. La vida media de anaquel es un factor determinante en la comercialización de un producto y se ha estimado que para los hongos el punto crítico es superar los 18 meses. (Feng *et al.*, 1994)

#### 1.1.3.4.1. Selección del organismo.

La selección de la cepa fúngica o de las especies en el caso de las plagas susceptibles a muchos patógenos es crítica debido a que la agresividad del hongo es altamente dependiente de la cepa. El grado de patogenicidad se basa en los resultados de progenie o mortalidad obtenida en las pruebas de



laboratorio. Los bioensayos realizados bajo condiciones de laboratorio invariablemente optimizan la potencialidad de los hongos y, por lo tanto, los resultados deben ser interpretados cuidadosamente. Por ejemplo, los bioensayos son realizados en ausencia de competidores microbianos, bajo condiciones ambientales ideales para el patógeno y con insectos cultivados *in vitro*, cuya fisiología puede ser diferente a la de los insectos de tipo silvestre. Estos bioensayos, podrían ser útiles para comparar cepas o especies que representan el paso preliminar antes de la experimentación en campo. (Hajek y St. Leger, 1994) Esto último es esencial para determinar si los requerimientos microclimáticos del patógeno y del hospedero coinciden, lo cual mostraría el verdadero potencial del hongo entomopatógeno como agente de biocontrol. También se debe determinar la estabilidad patogénica del hongo durante transferencias repetitivas. El medio utilizado para estas transferencias y para la producción subsecuente debe ser escogido con cuidado puesto que los nutrientes pueden influenciar marcadamente la viabilidad de las conidias. (Goettel, 1984) La especificidad de cepa seleccionada debe ser amplia ya que a nivel comercial es más ventajoso un producto con un amplio rango de hospederos. Sin embargo, el rango de hospederos debe excluir insectos benéficos, otros invertebrados y vertebrados. Se han realizado experimentos con muchos hongos entomopatógenos para probar sus efectos en vertebrados, especialmente para probar propiedades tóxicas, alérgicas o irritación. Solamente se han detectado respuestas alérgicas menores en algunos de los hongos entomopatógenos seleccionados.

**Tabla No. 2.** Formulados a partir de hongos entomopatógenos en investigación y desarrollo.

| Hongo                              | Organismo blanco           | Cultivo             |
|------------------------------------|----------------------------|---------------------|
| <i>Aschersonia aleyrodis</i>       | Mosquita blanca            | Tomate, pepino      |
| <i>Beauveria brongniartii</i>      | Mosquita blanca            | varios              |
| <i>Conidiobolus obscurus</i>       | Afidos                     | varios              |
| <i>Culicinomyces clavisporus</i>   | Larvas de mosquitos        | Ambientes acuáticos |
| <i>Entomophthora grylli</i>        | Saltamontes                | Varios              |
| <i>Erynia neocaphidis</i>          | Aphis fabae                | Frijol              |
| <i>Lagenidium giganteum</i>        | Mosquitos                  | Ambientes acuáticos |
| <i>Nomuraea rileyi</i>             | Larvas de lepidópteros     | Varios              |
| <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>   | Mosquita blanca            | Varios              |
| <i>Tolyocladium cylindrosporum</i> | Mosquitos                  | Ambientes Acuáticos |
| <i>Zoophthora radicans</i>         | Afidos                     | Varios              |
|                                    | Mariposa dorso de diamante | Crucíferas          |

Khachatourians, 1986; Libansky, 1989 y Rajnchapel-Messai, 1990.

El requisito más importante para la producción y aplicación de entomopatógenos es la seguridad. Aunque no hay reportes de que *P. fumosoroseus* infecte humanos, hay dos casos aislados en animales en 1962 y otras especies del género *Paecilomyces* podrían infectar pacientes humanos inmunodeprimidos. (Aguilar, et al., 1998) Por otro lado, se han aplicado formulados de *P. fumosoroseus* en cosechas de invernaderos de Estados Unidos y en campos de México por más de 5 años sin incidentes.

#### 1.1.3.4.2. Selección del propágulo.

Todos los hongos entomopatógenos se caracterizan por un ciclo bifásico: una fase vegetativa micelial y una fase reproductiva. Frecuentemente se encuentran dos tipos de esporas:

a). Esporas asexuales; que promueven la diseminación rápida del hongo.

- b). Esporas de resistencia; sexuales o clamidosporas vegetativas, responsables de la sobrevivencia del patógeno durante condiciones adversas o en ausencia del hospedero deseable.

Tabla No. 3. Productos comerciales basados en hongos entomopatógenos.

| HONGO  | PRODUCTO     | ORGANISMO BLANCO              | CULTIVO            | COMPANÍA (PAIS)            |
|--|--------------|-------------------------------|--------------------|----------------------------|
| <i>Beauveria bassiana</i>                          | Bea-Sin      | <i>Anthonomus grandis</i>     | Varios             | Agrobionusa (México)       |
|  | Betel        | <i>Haplochelus marginalis</i> | Maíz               | Calliope (Francia)         |
|  | Boverin      | N.D.                          | Maíz               | Glavimikrobioprurn (Rusia) |
|  | Mycotrol     | Mosca blanca, áfidos y trips  | Varios             | Mycotech Corp. (E.U.)      |
|  | Naturalis-O  | Diversos                      | Ornamentales       | Troy BioSciences (E.U.)    |
|  | Ostrinil     | <i>Ostrinia nubilalis</i>     | Maíz               | Calliope (Francia)         |
|  | N.D.         | Mosca blanca                  | Varios             | Fermona (E.U.)             |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>                      | Bio-Path     | <i>Blattella germanica</i>    | Granos almacenados | EcoScience Corp.(E.U)      |
|  | Meta-Sin     | <i>Aeneolamia postica</i>     | Varios             | Agrobionusa (México)       |
|  | Metasquino   | <i>Mahanarva posticata</i>    | Caña de azúcar     | IAA-Codecap (Brasil)       |
| <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>                   | Pae-Sin      | Mosca blanca                  | Varios             | Agrobionusa (México)       |
| <i>Arthrobotrys irregularis</i>                    | S350         | Nematodos                     | Florales           | Sutryyal (Francia)         |
| <i>Alternaria cassiae</i>                          | Casst        | <i>Cassia obtusifolia</i>     | Soya y algodón     | Mycogen Corp. (E.U.)       |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>              | Collego      | <i>Aeschynomene virginica</i> | Soya               | Ecogen (E.U.)              |
| <i>Endothia parasitica</i><br><i>Hipovirulenta</i> | E.P. Bioprox | <i>Endothia parasitica</i>    | Castaña            | INRA (Francia)             |
| <i>Phytophthora Palmivora</i>                      | DeVine       | <i>Morenia odorata</i>        | Cítricos           | Abbot labs. (E.U.)         |

Tomada de Lorence, 1996.

En teoría, cualquiera de estos propágulos fúngicos podrían ser considerado para la producción de micoinsecticidas. Debido a su papel principal dentro del proceso de infección, las esporas han sido consideradas desde el principio de la

historia del control biológico, como los propágulos fúngicos más adaptados para producción. (Lorence, 1996; Badii, M. *et al.*, 2000)

#### 1.1.3.4.3. Requerimientos nutricionales.

Los requerimientos nutricionales de los hongos entomopatógenos se han estudiado pobremente a pesar de que ésta información es esencial para la producción de biomasa celular. En particular, éste conocimiento puede permitir la simplificación del medio de cultivo y disminuir costos sin afectar la producción. La elección de los nutrientes industriales dependerá de los requerimientos nutricionales del hongo seleccionado. Por ejemplo, los Entomophthorales no metabolizan sacarosa (Latgé, 1988), y por lo tanto, todos los medios industriales para la producción de éste hongo deben excluir las fuentes de carbono extraídas de azúcar de caña, la cual tienen alto contenido de sacarosa y debe basarse en residuos de maíz ricos en dextrosa. Los hongos entomopatógenos requieren oxígeno, agua y una fuente orgánica de carbono y energía, una fuente de nitrógeno orgánico e inorgánico y elementos adicionales como minerales y factores de crecimiento. La fuente de carbono es usualmente dextrosa pero puede ser reemplazada por polisacáridos como almidón o lípidos. El nitrógeno puede ser suministrado en forma de nitrato, amonio o compuestos orgánicos como aminoácidos o proteínas. Otros macronutrientes esenciales son el fósforo (como fosfatos), potasio, magnesio y azufre, este último suministrado en su forma inorgánica (como sulfato) u orgánica (cisteína o metionina). Los microelementos esenciales usualmente

incluyen calcio, cobre, hierro, magnesio, molibdeno, zinc y vitaminas del complejo B solubles en agua, especialmente biotina y tiamina. Todos estos micronutrientes se encuentran en los materiales incluidos en los medios industriales pero pueden ser suministrados hidrolizados de proteínas o extractos de levaduras (Tabla No. 4). Los requerimientos nutricionales de los hongos entomopatogénicos varían con la especie o la cepa del hongo. (Feng *et al.*, 1994; Lorence, 1996)

#### 1.1.3.4.4. Producción de biomasa.

Los hongos pueden ser obtenidos de diferentes formas (micelios, conidias o blastosporas) dependiendo del proceso de producción. Cada una tiene sus ventajas y desventajas para el control biológico y para el procesamiento. La morfología juega un papel importante en la producción del micoinsecticida, debido a que la alta virulencia y estabilidad son características para un insecticida microbiano efectivo, así como los bajos costos de producción son determinantes para su éxito comercial. (López, *et al.*, 2000)

Los productos fúngicos de control biológico más ampliamente desarrollados son los que se basan en el hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Actualmente, la producción de este hongo se basa en técnicas de fermentación sumergidas y bifásicas. La fermentación bifásica combina las ventajas de los medios sólidos y líquidos, donde se deja crecer al hongo en el fermentador hasta terminar la fase logarítmica para obtener una máxima

producción de masa micelial, la cual es subsecuentemente transferida a substratos nutritivos o inocuos para la producción de las conidias aéreas en la forma de inóculo natural. Sin embargo, aunque el método bifásico es simple, se considera el más caro y de una labor intensiva. La fermentación sumergida es diseñada para tomar ventaja de los fermentadores industriales existentes, los cuales usualmente pueden contener hasta 200 m<sup>3</sup>. En las fermentaciones a gran escala se deben de tomar precauciones para controlar apropiadamente muchos factores (como aireación, pH, temperatura y espuma), los cuales pueden afectar significativamente la cantidad y calidad de la preparación fúngica. (Soper y Ward, 1981; Rombach, M. C. 1989)

**Tabla No. 4. Ingredientes de medios de cultivo para la producción de insecticidas microbianos**

| Substancias inorgánicas                         | Fuentes de carbono         | Fuentes de nitrógeno           |
|---|----------------------------|--------------------------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                  | Glucosa                    | Harina de soya                 |
| Na OH   | Jarabe de maíz             | Alimento de soya               |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                 | Almidón de maíz            | Alimento de semilla de algodón |
| Ca CO <sub>3</sub>                              | Alimento de maíz           | Maíz macerado                  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | Dextrina                   | Glúten de maíz                 |
| NH <sub>4</sub> OH                              | Sacarosa                   | Levadura de cerveza            |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Lactosa                    | Levadura primaria              |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Suero                      | Levadura hidrolizada           |
| Mg SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O         | Aceite de soya             | Peptona de soya                |
| Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O         | Aceite de manteca de cerdo | Lactoalbúmina                  |
| Zn SO <sub>4</sub>                              |                            |                                |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                 |                            |                                |
| Na NO <sub>3</sub>                              |                            |                                |

Adaptada de Valenzuela, 1987

#### 1.1.3.4.5. Recuperación.

Los procesos de recuperación dependen del sistema de producción empleado. Las esporas o micelio producidas en medios líquidos se pueden separar del caldo de fermentación mediante centrifugación o filtración directa, esto se facilita mediante el mezclado con un acarreador inorgánico o por ultracentrifugación, también la biomasa recuperada generalmente es muy sensible al secado y se deberá mantener húmeda hasta su formulación. Las esporas producidas en medios sólidos se pueden recuperar puras, y después secadas por aire al vacío; o en una mezcla de esporas con sustrato y después el medio se pulveriza. Las esporas se pueden lavar con un agente formulado, sin embargo se tiene que hacer una centrifugación adicional y secado. (Samson, *et al.*, 1988b)

#### 1.1.3.4.6. Formulaciones.

Existe muy poca información disponible con respecto a formulaciones debido a que esta tecnología tiende a permanecer como secreto industrial. En general, los agentes de formulación deben tener calidades de adhesión y asperjado y proteger al organismo de la desecación y de la degradación solar, antes y durante la germinación de la spora en el insecto blanco. Una formulación típica es la mezcla de varios productos que tienen que ser compatibles entre sí, estos incluyen: el ingrediente activo "esporas típicas"; un diluyente y/o un dispersante; un agente humectante y un adhesivo. Las formulaciones secas o líquidas están disponibles y la mayoría de ellas van dirigidas a insectos que

viven en el follaje. La selección del tipo de formulación va a depender del hábitat de la plaga. Existen tres tipos de formulaciones secas:

- a). Polvos: compuestos de 10 % de esporas y 90 % de arena fina (tamaño de la partícula 40  $\mu\text{m}$ ) como diluyente.
- b). Gránulos: hechos de ingrediente activo (5 al 20%), un acarreador (80 a 95%) y un agente de unión (1 a 5 %).
- c). Polvos humectables: consisten de una alta concentración de ingrediente activo (50 a 80%), un relleno como la arena (15 a 45%), un dispersante (1 a 5%), un surfactante (3 al 5%) y un vehículo el cual es agua o aceite (35 a 65%). (Samson, *et al.*, 1988b)

#### 1.1.3.5. Algunos productos comerciales.

El primer producto de origen biológico utilizado para el control de cucaracha europea (*Blattella germanica*) se reportó en Estados Unidos por la compañía EcoScience con el biopesticida Bio-Path, también se comercializa en otros países como Japón donde se estima un mercado de 100 y 125-150 millones de dólares para el control de cucarachas (Tabla No. 3). También en Estados Unidos la compañía mencionada anteriormente y Fermona comercializan productos basados en *B. bassiana* para el control de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Otros productos que compiten, recientemente entraron al mercado y son Naturalis-O y Naturalis-L ambos producidos por la compañía Troy BioScience, y se usan para el control de insectos plaga de plantas ornamentales y arácnidos de ornamentales respectivamente. (Lorence, 1996)



La compañía Agrobionsa de México, (Agrobiológicos del Noroeste, S. A. de C. V., Culiacán, Sinaloa) comercializa tres productos que son los siguientes:

- a). Bea-Sin, elaborado con *B. bassiana* y se utiliza para el control de el picudo del algodón (*Anthonum grandis thurberiae*), el picudo del chile y la mosquita blanca.
- b). Meta-Sin, formulado con *M. anisopliae* para el control de los picudos del algodón y chile, la mosca pinta (*Aeneoolamia postica*) y el barrenador de la caña (*Diatraea saccharalis*).
- c). Pae-Sin, elaborado con *P. fumosoroseus* para el control de huevecillos, ninfas y adultos de la mosquita blanca.

Brasil y Cuba son países donde este tipo de agentes son muy usados para el control de plagas y la producción es local. En Brasil alrededor de 600,000 hectáreas sembradas con caña de azúcar son tratadas con *M. anisopliae* para el control de *Mahanarva posticata*. Otros países de América Latina donde se producen y usan comercialmente los hongos entomopatógenos son Colombia, Costa Rica y Venezuela. (Jones, 1994)

La Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Regional (SAGAR) de México muestra un diagrama típico sobre la producción de esporas que provienen de hongos entomopatógenos en la Figura No. 2. Los granos agrícolas o residuos de ellos, son los substratos que más se emplean para

la propagación de estos hongos; el arroz es el más utilizado por conservar altos porcentajes de viabilidad y patogenicidad. Todo el material se esteriliza con vapor. Las esporas para inóculo se cultivan en tubos con agar, luego se transfieren a cada una de las bolsas de plástico o “matrices” para producción y se le adicionan antibióticos al medio (como tetraciclina o cloranfenicol), para eliminar riesgos de contaminación. La incubación tiene los siguientes requisitos: un cuarto con 14 horas de fotoperíodo, temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y el tiempo necesario para una máxima producción de esporas (es variable para cada especie, generalmente de 15 a 20 días). La recuperación de las esporas se lleva a cabo agregando tierra de diatomeas (como acarreador) a las bolsas de cultivo. Al final las esporas se almacenan en refrigeración donde permanecen viables hasta quince días. (Garza *et al.*, 1994; Lorence, 1996)

Un proceso de cultivo sólido para la producción de *B. bassiana* ha sido desarrollado recientemente por Mycotech Corporation, USA. En éste proceso, una fase líquida es absorbida en un substrato basado en almidón. El hongo crece en las partículas del substrato entre las cuales la fase gaseosa se mantiene disponible para la aireación. Con éste método se pueden obtener niveles de producción de  $1 \times 10^{13}$  conidias en volúmenes de fermentación de menos de 1 litro. Bajo producción piloto, se han reportado polvos secos con un promedio de  $2.6 \times 10^{11}$  conidias/gramo. (Bradley *et al.*, 1992)

### 1.1.3.6. Diseño de medios de cultivo.

En 1966, Samsinakova, obtuvo un rendimiento de materia seca de 68.7 mg/mL y una concentración de  $6.43 \times 10^8$  esporas/mL después de 72 h; al determinar el crecimiento y la producción de blastosporas de *B. bassiana*, en cultivos sumergidos con la siguiente composición: glucosa 2.5 %, almidón 2.5 %, líquido de remojo de maíz 2.0 %, Na Cl 0.5 % y CaCO<sub>3</sub> 0.2 %, a un pH de 4.5. (Samsinakova, 1966)

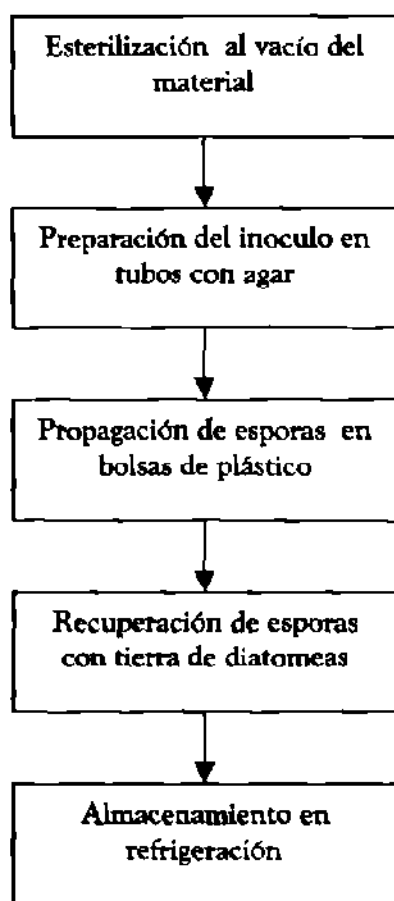


Figura No. 2. Proceso para la producción de hongos entomopatógenos.

Agudelo y Falcon (1983), menciona que la producción de cuerpos hifales en la superficie de las hojas de los cultivos tratados, causó una mortalidad del 70 % al 90 % en combinaciones de humedad (70%) y temperatura (15°C) relativas a larvas de *Spodoptera exigua* ensayadas con *Paecilomyces farinosus* en cultivos líquidos agitados. En el mismo año, reportan con *Verticillium lecanii* rendimientos de  $5 \times 10^7$  blastosporas/mL. (Lisansky y Hall, 1983) Más adelante, Campbell trabajó con medios sintéticos líquidos cultivados en matraces, conteniendo una de las 22 fuentes de carbohidratos individuales con *B. bassiana* y *M. Anisopliae*; encontró que *B. bassiana* crece mejor en D-melzitose, mientras que la esporulación es mejor en sacarosa, trealosa y glucosa. Respecto a *M. anisopliae* en manosa crece mejor y esporula mejor con inositol y glicerol. (Campbell *et al.*, 1983)

Goettel, 1984 describió un método simple y barato para el cultivo de hongos entomopatógenos usando salvado de trigo, celofán y bolsas autoclaveables. Con éste método, se obtuvieron niveles de producción de  $1 \times 10^{10}$  conidias/g de biomasa seca de *B. bassiana* y muchos otros hongos.

Con respecto a la producción de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo complejos sumergido, se observó un incremento en el contenido de glicógeno de las blastosporas producidas en cultivos limitados por nitrógeno que las limitadas por carbono, y sugieren que el contenido de glicógeno puede influenciar en la longevidad de las esporas almacenadas. (Inch *et al.*, 1986)

Por otro lado, se produjeron conidias de *B. bassiana* en salvado de trigo, obteniendo baja producción de masa usando un proceso de fermentación bifásica. Sin embargo, más del 95% de las conidias germinaron en pruebas de viabilidad después de más de tres años de almacenamiento a 4° C. (Rombach *et al.*, 1988)

En la década pasada, entomólogos y microbiólogos Chinos mejoraron exitosamente la tecnología tradicional de fermentación bifásica para la producción de biomasa en polvo de conidias puras de *B. bassiana* para el control a gran escala de la oruga del pino y otros insectos. (Li y Yang, 1988)

Más adelante se obtuvo una producción de  $2 \times 10^{11}$  gramos de conidias de *B. bassiana* en preparación en polvo, usando arroz como sustrato de crecimiento básico. (Alves y Pereira, 1989)

En cultivos batch y feed batch limitados por glucosa y amonio; 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 formó esporas durante la fase estacionaria. Con respecto al cultivo "feed batch" limitado por glucosa y amonio, la concentración de blastosporas para *P. farinosus* fue inversamente relacionada con la tasa de dilución. (Humphreys *et al.*, 1990)

En cultivos sumergidos de *B. bassiana* utilizando el medio de Vogel modificado, demostraron que las blastosporas cosechadas de la fase estacionaria de cultivos limitados de nitrógeno contenían más reservas endógenas (carbohidratos, incluyendo glicógeno y lípidos) que los limitados por fuente de carbono y el tipo de blastosporas formadas conservaba su viabilidad durante su almacenaje a 25°C. (Lane *et al.*, 1991a) En el mismo año Lane *et al.*, determinaron la Concentración Letal Media (LC<sub>50</sub>) y el Tiempo Letal Medio (LT<sub>50</sub>) contra adultos de *Nephotettix virescens* con las conidias y blastosporas de *B. bassiana* producidas en cultivos limitados de carbono y de nitrógeno; y encontraron que no había diferencia significativa entre las LC<sub>50</sub> de las blastosporas producidas en ambos medios de cultivo, mientras que con las conidias fueron menos virulentas. Por otra parte los valores de la LT<sub>50</sub> de las conidias y las blastosporas de los cultivos limitados por nitrógeno, fueron significativamente más bajos que los valores producidos en cultivos limitados por carbono. Durante el almacenaje a 25°C hubo un incremento en las LT<sub>50</sub> de las conidias y blastosporas, relacionándolo con la viabilidad de las esporas. (Lane *et al.*, 1991b)

De la Torre y Cárdenas Cota en 1996, reportaron la producción de conidias en cultivo sumergido de *P. fumosoroseus*, usando una fuente simple de carbono, glucosa (30 g/L); y una fuente simple de nitrógeno, nitrato de amonio (0.7 g/L) suplementada con extracto de levadura (1 g/L). Las conidias sumergidas se presentaron en una concentración de 10 conidias/mL en un

fermentador de 6 L (4-L-V) manteniendo el oxígeno disuelto sobre 20 % de saturación con aire; alta relación C:N es necesario para la producción de conidias sumergidas.

Jackson *et al.*, 1997, trabajaron distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de carbono y relaciones de carbono:nitrógeno, para producir blastosporas de *P. fumosoroseus* tolerantes a la desecación. Todos los medios probados soportaron la esporulación en cultivos sumergidos, incrementaron la concentración de blastosporas ( $5.8 \times 10^8$  esporas/mL) cuando se produjeron en medios conteniendo 80 g de glucosa y 13.2 g de casaminoácidos, y un alto porcentaje de las blastosporas (79%) sobreviven al secado por aire. Las blastosporas de *P. fumosoroseus* secadas por aire tienen una LD<sub>50</sub> de 60 y 113 blastosporas/mm<sup>-3</sup> para *B. argentifolli* en dos bioensayos separados con relaciones de 3.9 y 3.8 (LD<sub>50</sub> *B. bassiana* y LD<sub>50</sub> *P. fumosoroseus*) respectivamente.

Recientemente se cultivaron conidias y esporas de *B. bassiana* provenientes de un aislamiento de la colección de cepas de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en medio líquido con la siguiente composición (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno, melaza como fuente de carbono y (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>) como fuente de

potasio. Con este medio de cultivo obtuvieron 2.476 g de biomasa/L de medio y  $2.256 \times 10^7$  esporas/mL. (García, G. *et al.*, 1997)

#### 1.1.4. *Paecilomyces fumosoroseus*

##### 1.1.4.1. Distribución.

*P. fumosoroseus*, (Deuteromicotina: Hyphomycetes) es un hongo potencialmente útil para el biocontrol de plagas de importancia económica en la Agricultura, tal como la mosca blanca (*B. tabaci*). Por otra parte *P. fumosoroseus* es una especie ampliamente distribuída geográficamente que puede infectar diferentes órdenes de insectos en todas las etapas de su desarrollo, además es aislada frecuentemente de muestras de suelo. (Samson, 1974; Tigano-Milani *et al.*, 1963) Recientemente, en diferentes partes del mundo, en Estados Unidos y subcontinente de la India, *P. fumosoroseus* ha atacado a *B. tabaci* y provocado verdaderas epizootias. (Lacey, *et al.*, 1993)

##### 1.1.4.2. Morfología.

*P. fumosoroseus* se identifica por la formación de hifas hialinas, amarillentas, septadas y de paredes lisas. Las estructuras conidiógenas en su mayoría consisten de ramales de conidioforos verticales o irregulares, (sinetosas o mononematosas) presentando en la parte terminal cada rama acumulos de células de conidiógenas. Este tipo de células son fialídicas y consisten de una



parte basal cilíndrica o hinchada, que rápidamente termina en un cuello largo muy distintivo. (Samson, 1974)

#### 1.1.4.3. Modo de acción.

*P. fumosoroseus* causa la mortalidad entre 24 y 48 horas en todos los estadios de la mosca blanca. Se ha demostrado mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión y de barrido que la conidia ataca el dorso del insecto, los tubos germinativos penetran y en 24 horas las hifas se forman en el hemocele. Finalmente el micelio emerge del cuerpo en 48 horas y esporula a las 72 horas. (Osborne, et al., 1990)

#### 1.1.4.4. Rango de hospederos.

El interés en el desarrollo comercial de *P. fumosoroseus* comenzó a finales de 1980 cuando *B. tabaci* y en especial *B. argentifolii* se dispersaron rápidamente y llegaron a ser una peste importante en campos e invernaderos. El daño alrededor del mundo es estimado en cientos de millones de dólares anualmente. (Vidal, et al., 1998) Las pérdidas económicas atribuidas a *B. argentifolii* en los Estados Unidos fueron estimadas en 1 billón de dólares en 1992, otra plaga susceptible a *P. fumosoroseus* es *Diuraphis noxia* que ha causado un impacto económico directa e indirectamente en 1 billón de dólares desde mediados de los 80's sólo en E.U.A. (Vandenberg, J. D., 1996)

*P. fumosoroseus* se ha descrito como un patógeno natural investigado para el control biológico de 41 especies de plagas de 8 ordenes de insectos. Dentro del uso para control que se le ha dado a este hongo están las siguientes: mariposa del fruto del durazno (*Carposina sasakii* Matsumura), termitas, escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), mariposa gypsy (*Lymantria dispar* L y *Galleria mellonella* L). (Samson, 1974)

#### 1.1.4.5. Producción de blastosporas.

*P. fumosoroseus* crece como micelio en superficie o en cultivo sumergido. Las conidias aéreas son la resistencia natural y dispersión del hongo. (López, *et al.*, 2000) Las blastosporas o cuerpos de hifas son células sencillas de pared delgada o fragmentos miceliales, que son producidas en las puntas de las hifas o directamente de blastosporas individuales. (Jackson *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 1998)

En las fermentaciones líquidas los parámetros y diseños se están estudiando y pueden ser controlados mediante computadoras automatizadas. La producción es rápida, reduce problemas de contaminación, pero el tipo de propágulo formado puede no estar disponible para la subsecuente aplicación en campo. Por el contrario en fermentaciones sólidas los costos de energía son bajos y todos los tipos de propágulo pueden ser producidos. Además, la sobrevivencia de estos propágulos es relativamente alta y el hongo puede

utilizar el sustrato sólido como una infección producida en la naturaleza. (Samson, et al., 1988b)

El fermentador de tanque agitado es uno de los bioreactores más usados comúnmente, tiene una forma de un cilindro vertical con un mecanismo de agitación colocado centralmente; estos reactores producen una agitación fuerte al medio de cultivo con buena homogenización y un alto coeficiente de transferencia de gas, y evita la agregación del micelio. Sin embargo un inconveniente es el daño que causa al micelio al estar en contacto con el sistema de agitación. Los tanques de fermentación agitado han sido empleados para la producción de micelio y levaduras de todos los hongos entomopatógenos más comunes. (Samson, et al., 1988c) Por otra parte, para el desarrollo de un medio de cultivo se debe tomar en cuenta su sencillez, así como el aspecto económico, esto repercute en la comercialización del producto, llegando a ser un factor limitante en su aceptación y uso. Un medio de cultivo debe contener básicamente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y condiciones controladas en el proceso de desarrollo de los hongos como son: temperatura, pH y aireación. (Valenzuela, 1987)

## 1.2. HIPÓTESIS

Los medios de cultivo líquidos a base de sacarosa como fuente de carbono y harina de soya o peptona de colágena como fuente de nitrógeno pueden mejorar la eficiencia de la producción y sobrevivencia de blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus*, con respecto al medio de cultivo a base de casaminoácidos.

### 1.3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en diferentes medios de cultivo líquidos a base de sacarosa como fuente de carbono y harina de soya o peptona de colágena como fuente de nitrógeno a nivel matraz y seleccionar el medio óptimo para la producción en fermentador de 5 L.

#### 1.3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Probar medios de cultivo líquidos con diferentes concentraciones de fuente de carbono (sacarosa) y de nitrógeno (harina de soya o peptona de colágena).
2. Producir blastosporas de *P. fumosoroseus* a nivel matraz en los diferentes medios de cultivo diseñados.
3. Evaluar la sobrevivencia a diferentes intervalos de tiempo a los productos obtenidos con los medios de cultivo formulados.
4. Producir blastosporas de *P. fumosoroseus* a nivel fermentador (250 r.p.m – 1.0 v.v.m. y 400 r.p.m. – 1.5 v.v.m.) con el medio de cultivo que favoreció la producción de blastosporas a nivel matraz.
5. Evaluar la sobrevivencia a diferentes intervalos de tiempo a los productos obtenidos de las fermentaciones.

## 2. MATERIAL Y METODOS

### 2.1. Obtención y conservación del material biológico.

En el presente estudio se utilizó el hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* clave Pfr-612, aislado de la mosquita blanca (*B. argentifolii*) en Weslaco, Texas. El microorganismo fue proporcionado por Collection of Entomopathogenic Fungi del United States Department of Agriculture - Agriculture Research Service (USDA-ARS), con sede en Peoria, Illinois. Esta cepa se proporcionó en viales criogénicos conteniendo glicerol al 10%. Para la conservación de la cepa, se tomaron 100  $\mu$ L del vial y se sembraron por extensión en Agar Papa Dextrosa DIFCO<sup>R</sup>(PDA) y luego se incubaron a temperatura ambiente durante 2 semanas. Posteriormente de este cultivo se realizaron cortes de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>, se depositaron en glicerol SIGMA<sup>R</sup> 10 % y se almacenaron a -80 °C.

### 2.2. Medios de cultivo.

Con el objetivo de seleccionar los medios de cultivo más favorables para la producción y sobrevivencia en almacenaje de las blastosporas de *P. fumosoroseus*, se probaron diferentes medios de cultivo líquidos, utilizando sacarosa como fuente de carbono y harina de soya o peptona de colágena como fuente de nitrógeno. (Tabla No. 5) Los medios probados contenían en su formulación 50 % de medio basal (Tabla No. 6). Como control se utilizó el medio reportado por Jackson, et al., 1997. Los experimentos se realizaron por

triplicado y los resultados se sometieron a un Análisis de Varianza y una comparación múltiple de medias mediante una prueba de Tukey, con una  $p < 0.05$  (SPSS 8.0 for Windows). Los experimentos se realizaron en tres etapas:

#### **2.2.1. Diseño de medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa.**

En la Tabla No. 5 se muestran los medios de cultivo diseñados con diferentes concentraciones de sacarosa como fuente de carbono y harina de soya constante (3.0 g) como fuente de nitrógeno y corresponden a A-1, A-2, A-3 y A-4.

#### **2.2.2. Diseño de medios de cultivo con diferentes concentraciones de harina de soya.**

Se seleccionó 8.0 g de sacarosa del medio A-1. Después se diseñaron medios de cultivo con esta concentración de sacarosa y 5 concentraciones diferentes de harina de soya, cuya composición se muestra en la Tabla No. 5 y corresponden a los medios de cultivo B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5.

#### **2.2.3. Diseño de medios de cultivo con dos concentraciones de sacarosa y peptona de colágena como fuente de nitrógeno.**

En los medios de cultivo anteriores el proceso de recuperación de blastosporas se dificulta, debido a la gran proporción de sólidos insolubles provenientes de

la harina de soya. Por tal motivo se buscó una alternativa para sustituir esta fuente de nitrógeno y se probó con la peptona de colágena, es más soluble y facilita el proceso de secado. Los medios de cultivo diseñados se muestran en la Tabla No. 5 y corresponden a C-1 y C-2.

Tabla No. 5. Comparación de los medios de cultivo estudiados.

| Medios de cultivo | Ingrediente (%) |                     |                |          |         |
|-------------------|-----------------|---------------------|----------------|----------|---------|
|                   | Harina de soya  | Peptona de colágena | Casaminoácidos | Sacarosa | Glucosa |
| A-1               | 3.0             |                     |                | 8.0      |         |
| A-2               | 3.0             |                     |                | 6.0      |         |
| A-3               | 3.0             |                     |                | 4.0      |         |
| A-4               | 3.0             |                     |                | 2.0      |         |
| B-1               | 3.8             |                     |                | 8.0      |         |
| B-2               | 3.0             |                     |                | 8.0      |         |
| B-3               | 2.4             |                     |                | 8.0      |         |
| B-4               | 1.5             |                     |                | 8.0      |         |
| B-5               | 0.8             |                     |                | 8.0      |         |
| C-1               |                 | 4.5                 |                | 2.0      |         |
| C-2               |                 | 4.5                 |                | 10.0     |         |
| Control           |                 |                     | 2.5            |          | 8.0     |



**Tabla 6. Componentes del medio basal.**

| Ingrediente:                               | Cantidad (g/L) |
|--|----------------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                   | 4.000          |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.600          |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ | 0.800          |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.100          |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  | 0.037          |
| $\text{MnSO}_4$                            | 0.016          |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  | 0.014          |

### 2.3. Experimentos realizados a nivel matraz.

#### 2.3.1. Activación de la cepa.

A partir de los viales de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) se tomaron 100  $\mu\text{L}$  para activar la cepa en PDA, luego se incubaron a temperatura ambiente por 14 a 21 días.

#### 2.3.2. Preparación del inóculo.

Para obtener una concentración de  $5 \times 10^5$  conidias/mL; al cultivo anterior se le adicionaron 5.0 a 10.0 mL de agua destilada estéril (para remover las conidias del micelio) y de esta suspensión se transfirió de 1.0 a 5.0 mL al frasco de dilución que contiene agua destilada, después se contaron las conidias en un hemocitometro hasta obtener un promedio de 50 conidias entre los cuatro

cuadrantes, equivalentes a  $5 \times 10^5$  conidias/mL. Posteriormente se depositó un 10 % (v/v) de la suspensión a matraces Erlenmeyer bafleados de 500 mL de capacidad conteniendo 100 mL del medio Jackson *et al.*, 1997, pero con 1.5 % de casaminoácidos. Se incubaron a 300 r.p.m. (New Brunswick Scientific) 28°C por 72 horas.

### **2.3.3. Producción de blastosporas.**

A cada uno de los medios de fermentación y al control se les depositaron  $1 \times 10^6$  blastosporas/mL del cultivo anterior. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio diseñado y control (Tabla No. 5). Se mantuvieron en agitación rotatoria (New Brunswick Scientific) a 300 r.p.m. a una temperatura de 28°C durante 72 horas. Al finalizar el proceso de fermentación se determinaron blastosporas/mL y viabilidad de las esporas antes de secarlas; el resto del producto se sometió al proceso de secado por aire.

#### **2.3.3.1. Cuenta de blastosporas.**

De cada uno de los productos obtenidos con los diferentes medios de cultivo estudiados se tomó 1.0 mL y se diluyó con 9.0 mL de agua destilada estéril, contenida en tubos de ensaye (dilución 1:10); posteriormente se efectuaron diluciones de 1:100 y 1:1000. Finalmente se efectuó un recuento de las esporas en el hemocitometro y se reportaron blastosporas/mL.

## 2.4. Recuperación de las blastosporas.

Se realizó al final de la fermentación. Se utilizó el método de secado por aire y consistió en lo siguiente: el medio de fermentación de cada uno de los diferentes cultivos experimentados se pasó dos veces a través de una malla, con la finalidad de eliminar el micelio. Después el sobrenadante recuperado se mezcló con 5% de tierra de diatomeas (w/v) (HYFLO, Celite, Corp. Lompoc, CA U.S.A.) y se filtró al vacío con papel filtro Whatman No.1. El filtrado se dejó secar toda la noche a temperatura ambiente y 65% de humedad relativa, luego se raspó para recuperarlo y pulverizarlo con un mortero. El extracto recuperado fue empacado en bolsas de plástico selladas al vacío (Empacadora de vacío, Marca Webomatic) y almacenadas a 4°C. A los extractos obtenidos con los medios de cultivo diseñados se les determinaron pruebas de viabilidad a diferentes intervalos de tiempo para ver la sobrevivencia de las blastosporas: 1, 7, 30, 60, 90, 120 y 150 días o hasta llegar a un 50% de viabilidad.

### 2.4.1. Viabilidad.

Se realizó de acuerdo a la germinación de las blastosporas. El criterio para considerar una spora germinada es cuando se forma un tubo germinativo tan largo como la mitad del diámetro de la spora. El método consistió en lo siguiente: se tomó una muestra pequeña del extracto (50 mg) y se mezcló con 50 mL de caldo dextrosa sabouraud (BIOXON<sup>®</sup>) contenida en matraces Erlenmeyer bafleados de 250 mL de capacidad. Este cultivo se mantuvo en agitación rotatoria (New Brunswick Scientific) a 300 r.p.m., 28°C por 6

horas. Después se realizaron frescos directos de cada uno de los cultivos y se contaron 100 blastosporas (germinadas y no germinadas); para sacar la proporción de esporas viables. La viabilidad de las blastosporas se expresó en porcentaje de germinación. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de Tukey con una  $p < 0.05$ .

## 2.5. Bioensayos preliminares en dieta artificial.

La determinación de la mortalidad se hizo por medio de bioensayos, con larvas de *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, *Heliiothis virescens* y *Diatrea sacharalis*, y se realizaron de la siguiente manera:

Se utilizaron copas del No. 0, las cuales contenían dieta artificial Shorei, ésta se roció con 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de blastosporas frescas (recién cosechadas), resuspendidas en agua. El producto rociado tenía una concentración de  $1 \times 10^8$  blastosporas/mL, y se obtuvo de una fermentación de 3 días con el medio de casaminoácidos como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono. Para cada formulado y su blanco se utilizaron 25 copas por triplicado, para dar un total de 75 copas. En cada una se colocó una larva neonata de cada insecto. Cada copa se tapó y se colocaron 25 copas en cada bolsa de papel previamente etiquetada y luego se cerraron. La mortalidad se determinó diariamente, hasta llegar al séptimo día. A los datos obtenidos se les determinó el porcentaje de mortalidad.

## 2.6. Experimentos a nivel fermentador.

El medio de cultivo que presentó los resultados más óptimos en relación a la producción de esporas fue seleccionado y extrapolado a un Microfermentador (Modelo Bioflo III New Brunswick Scientific Co., Inc) de cinco litros de capacidad de acuerdo a la siguiente metodología:

### 2.6.1. Activación de la cepa.

Descrita anteriormente en el punto 3.1.

### 2.6.2. Preparación del inóculo.

Descrita anteriormente en el punto 3.2.

### 2.6.3. Producción de blastosporas.

Del cultivo anterior se depositaron  $1 \times 10^6$  blastosporas/mL al Microfermentador de cinco litros de capacidad conteniendo 3 litros del medio de cultivo seleccionado. Los experimentos se realizaron por triplicado.

### 2.6.4. Condiciones de fermentación.

Para tratar de encontrar una alta concentración y una mayor sobrevivencia de las blastosporas se utilizaron dos combinaciones de aereación y agitación: 1.0 v.v.m y 250 r.p.m.; 1.5 v.v.m. y 400 r.p.m. La temperatura durante el proceso de fermentación se mantuvo a  $28^{\circ}\text{C}$ . El tiempo del proceso se consideró hasta llegar a una concentración de blastosporas  $\times 10^8$ . Para controlar la espuma se

utilizó el antiespumante tipo "A" de siliconas Dow Corning al 10%, agregándose durante la fermentación bajo condiciones necesarias. Durante el proceso de fermentación se colectaron muestras de 10 mL del Microfermentador cada 2 horas para determinar lo siguiente: concentración de blastosporas/mL y pH; también se tomaron lecturas del porcentaje de Oxígeno consumido. Al terminar el proceso, la biomasa se sometió al proceso de secado por aire.

#### **2.6.4.1. Cuenta de blastosporas.**

A las muestras colectadas cada 2 horas se les determinó la concentración de blastosporas/mL de acuerdo a la metodología descrita a nivel matraz.

#### **2.6.4.2. Medición de pH.**

Se midió con el potenciómetro a las muestras colectadas cada 2 horas.

### **2.7. Recuperación de las blastosporas.**

Al finalizar el proceso de fermentación, la biomasa se sometió al proceso de secado por aire, de acuerdo a la metodología descrita en el punto 3.4.

#### **2.7.1. Viabilidad.**

Se siguió el procedimiento descrito en el punto 3.4.1.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Nivel matraz.

##### 3.1.1. Medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa.

###### 3.1.1.1. Concentración de blastosporas.

En la Figura No. 3, se muestran los resultados obtenidos de la concentración de blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas a las 72 horas de las fermentaciones en diferentes medios de cultivo a nivel matraz, el valor para el medio de cultivo A-1 fue el mayor ( $7.0 \times 10^8$  blastosporas/mL) de los medios probados (Tabla No. 5). En el ANOVA se encontró que existe diferencia significativa entre los datos de los medios. Sin embargo no hay diferencia significativa entre los datos de los medios A-2, A-3 y A-4. La comparación de medias nos sugiere que el medio A-1 es similar al control; por lo tanto se consideró esta concentración de sacarosa para el diseño de los medios de cultivo posteriores, combinada con diferentes concentraciones de harina de soya.

###### 3.1.1.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas.

En la Figura No. 4 se muestra una comparación de los resultados obtenidos en la viabilidad de las blastosporas de *P. fumosoroseus*, en diferentes medios de cultivo, vemos que la sobrevivencia después de terminar el proceso de fermentación es de 90 a 100% en todos los medios de cultivo probados.

También se observa que después de secar las muestras por aire con 5% de tierra de diatomeas la viabilidad se afecta ligeramente entre 85 y 97%. En la Figura No. 5 se muestran los resultados de sobrevivencia de las blastosporas obtenidas en los medios de cultivo estudiados a diferentes periodos de tiempo. Se observó un bajo índice de sobrevivencia después de 60 días: 46% en el medio A-1, 54% en el A-2 y un 29% en el A-4. El medio A-3 muestra una viabilidad similar (75%) al control. Se encontró que existe diferencia significativa entre los valores de los medios de cultivo probados  $p < 0.05$ , a diferentes intervalos de tiempo (Tabla No. 7).

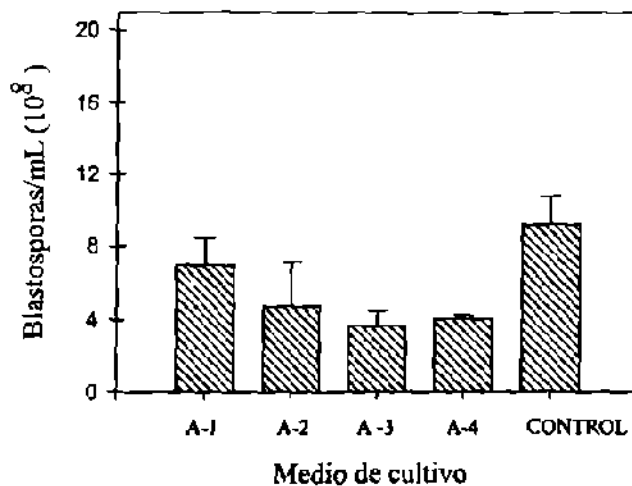


Figura No. 3. Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa y harina de soya. Las barras representan la desviación estándar de las blastosporas/mL.



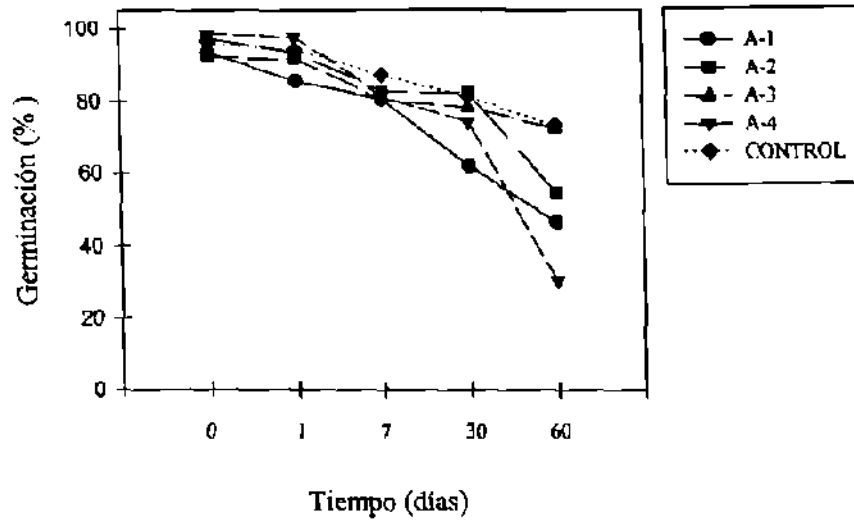


Figura No. 4. Comparación de los medios de cultivo a base de diferente concentración de sacarosa y harina de soya, en la germinación de blastosporas de *P. fumosoroseus*.

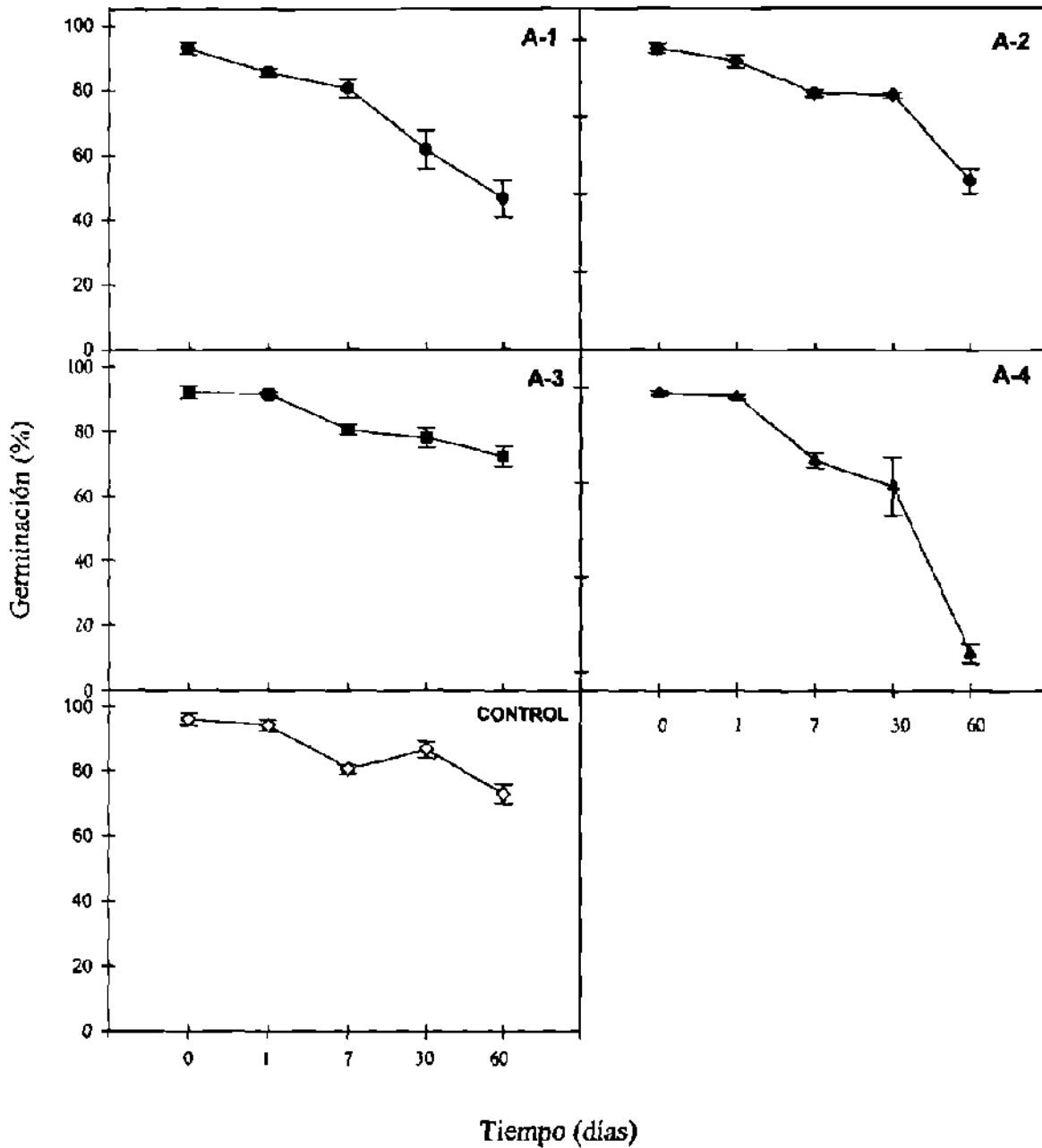


Figura No. 5. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en los medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa y harina de soya. Las barras representan la desviación estándar del % de germinación.

Tabla No. 7. Germinación de las blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en medios de cultivo a diferente concentración de sacarosa y harina de soya.

| Tiempo (días) | Medios de cultivo | % Germinación $\pm$ DS        |
|---------------|-------------------|-------------------------------|
| 0             | A-1               | 93.0 $\pm$ 1.7 <sup>a,b</sup> |
|               | A-2               | 97.3 $\pm$ 1.5 <sup>bc</sup>  |
|               | A-3               | 92.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>   |
|               | A-4               | 98.7 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>   |
|               | Control           | 96.0 $\pm$ 2.0 <sup>abc</sup> |
| 1             | A-1               | 85.3 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>   |
|               | A-2               | 93.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>   |
|               | A-3               | 91.3 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>   |
|               | A-4               | 97.7 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup>   |
|               | Control           | 94.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>   |
| 7             | A-1               | 80.3 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>   |
|               | A-2               | 82.7 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>   |
|               | A-3               | 80.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>   |
|               | A-4               | 81.0 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 80.0 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>   |
| 30            | A-1               | 61.7 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>   |
|               | A-2               | 82.0 $\pm$ 1.0 <sup>b</sup>   |
|               | A-3               | 78.0 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>   |
|               | A-4               | 74.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>   |
|               | Control           | 86.7 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>   |
| 90            | A-1               | 46.3 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>   |
|               | A-2               | 54.3 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>   |
|               | A-3               | 72.3 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>   |
|               | A-4               | 29.7 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 73.0 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>   |

DS: Desviación estándar. n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes Significativamente entre los medios de cultivo para un día. Tukey P<0.05

### 3.1.2. Medios de cultivo con diferentes concentraciones de harina de soya.

#### 3.1.2.1. Concentración de blastosporas.

En la Figura No. 6, se muestran los valores obtenidos del conteo de blastosporas/mL de *P. fumosoroseus* después de 72 horas de fermentación en matraces baficados con diferentes medios de cultivo formulados. Observamos que el valor del medio B-1 fue el mayor ( $11.2 \times 10^8$  blastosporas/mL), incluyendo al control ( $10.1 \times 10^8$  blastosporas/mL); el medio B-2 muestra una concentración menor ( $3.00 \times 10^8$  blastosporas/mL). Se encontró que existe diferencia significativa entre los datos de los medios,  $P < 0.05$ . Los datos nos sugieren que el medio B-1, es el medio de cultivo óptimo para escalarlo a nivel de fermentador, sin embargo falta determinar la sobrevivencia para poder seleccionarlo y extrapolarlo.

#### 3.1.2.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas.

En la Figura No. 7 y No. 8 se muestra una comparación de los resultados obtenidos en la viabilidad de los extractos de *P. fumosoroseus*, las cuales se produjeron en diferentes medios (B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5), vemos que la sobrevivencia al terminar el proceso de fermentación es alrededor del 100% para todos los medios de cultivo en el "0" día. Observamos que después del proceso de secado por aire en el 1er. día, una viabilidad de 90 a 95% en todos los medios de cultivo. Posteriormente los extractos se almacenaron a 4°C y el valor del medio B-5 muestra un bajo índice de sobrevivencia (53%) después

de 120 días (4 meses), incluso el medio control (43%). Por otra parte los medios de cultivo B-1, B-2, B-3 y B-4 mostraron viabilidades similares en ese período de almacenamiento (66 a 74% de germinación). Estos valores encontrados se presentan a partir de los 30 días de almacenamiento, el medio B-5 y el control disminuyen ligeramente.

Se encontró que existe diferencia significativa entre los valores de los medios de cultivo, a diferentes intervalos de tiempo (7, 30, 60 y 120 días), mientras que en el "0" y 1 días, no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo, (Tabla No. 8). El medio de cultivo B-1 se consideró el óptimo en la cuenta de blastosporas/mL y con respecto a la sobrevivencia resultó de los más viables hasta los 4 meses de almacenamiento; por lo cual se podría escalar a nivel fermentador.

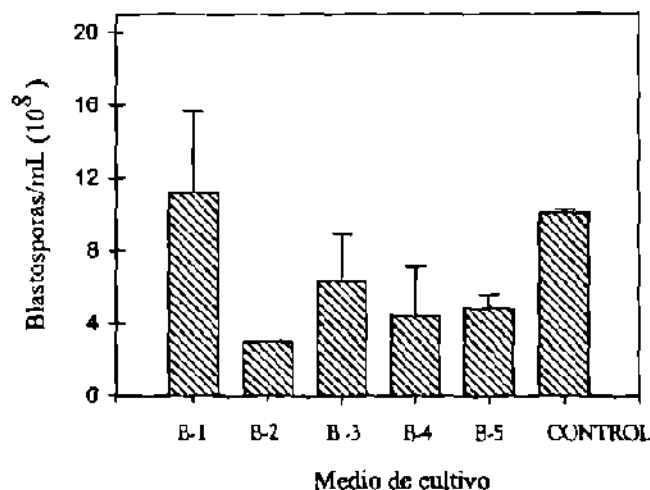
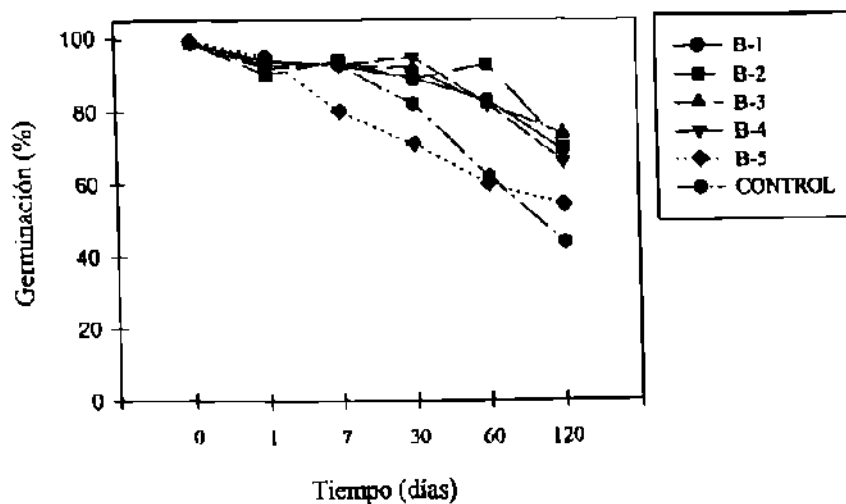


Figura No. 6. Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con diferente concentración de harina de soya. Las barras representan la desviación estándar de las blastosporas/mL.



**Figura No. 7.** Comparación de los medios de cultivo a base de diferente concentración de harina de soya, en la germinación de blastosporas de *P. fumosoroseus*

PRODUCCIÓN EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO Y SOBREVIVENCIA DE BLASTOSPORAS  
 DE *Paeclomyces fumosoroseus* (Wiza) Brow. & Smith. (Deuteromycotina: Hyphomycetes)

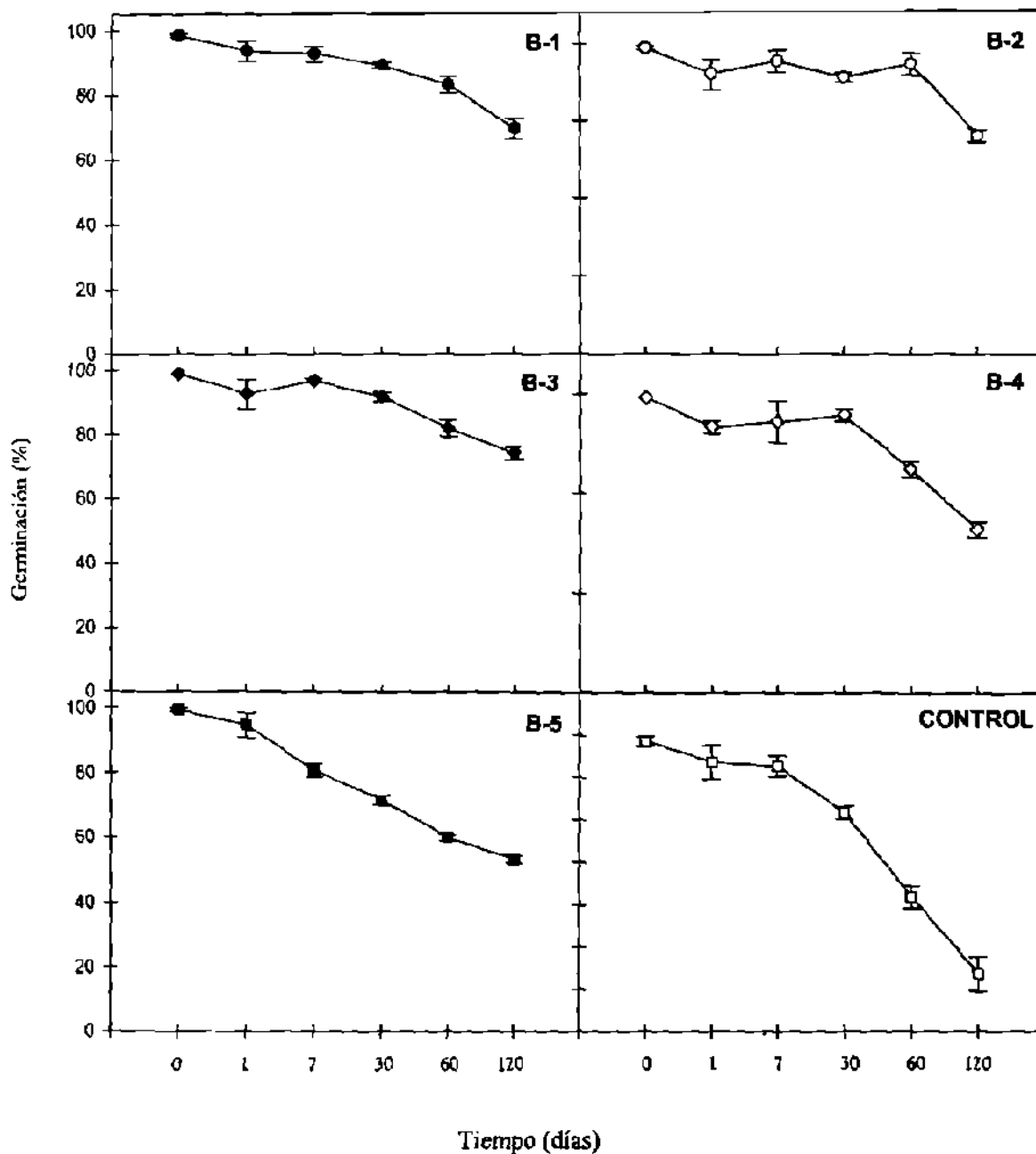


Figura No. 8. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en medios de cultivo con diferente concentración de harina de soya. Las barras representan la desviación estándar del % de germinación.

Tabla No. 8. Germinación de las blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en medios de cultivo a diferente concentración harina de soya.

| Tiempo (días) | Medios de cultivo | % Germinación $\pm$ DS        |
|---------------|-------------------|-------------------------------|
| 0             | B-1               | 98.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>   |
|               | B-2               | 98.6 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>   |
|               | B-3               | 99.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>   |
|               | B-4               | 99.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>   |
|               | B-5               | 99.3 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 98.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>   |
| 1             | B-1               | 93.6 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>   |
|               | B-2               | 90.0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>   |
|               | B-3               | 92.7 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup>   |
|               | B-4               | 91.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>   |
|               | B-5               | 94.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 93.7 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>   |
| 7             | B-1               | 92.7 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>   |
|               | B-2               | 94.0 $\pm$ 3.6 <sup>b</sup>   |
|               | B-3               | 96.7 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>   |
|               | B-4               | 93.0 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>   |
|               | B-5               | 80.1 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 92.7 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>   |
| 30            | B-1               | 89.0 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>   |
|               | B-2               | 88.7 $\pm$ 1.5 <sup>c</sup>   |
|               | B-3               | 91.2 $\pm$ 1.5 <sup>cd</sup>  |
|               | B-4               | 94.7 $\pm$ 1.5 <sup>d</sup>   |
|               | B-5               | 71.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 81.6 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>   |
| 60            | B-1               | 83.0 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>   |
|               | B-2               | 83.0 $\pm$ 3.6 <sup>c</sup>   |
|               | B-3               | 81.0 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>   |
|               | B-4               | 60.0 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>   |
|               | B-5               | 62.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>   |
|               | Control           | 62.0 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>   |
| 120           | B-1               | 69.3 $\pm$ 3.05 <sup>cd</sup> |
|               | B-2               | 70.0 $\pm$ 2.0 <sup>cd</sup>  |
|               | B-3               | 74.0 $\pm$ 2.00 <sup>d</sup>  |
|               | B-4               | 66.0 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>   |
|               | B-5               | 53.3 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>   |
|               | Control           | 43.60 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>  |

DS: Desviación estándar. n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes significativamente entre los medios de cultivo para un día. Tukey  $P < 0.05$ .



### 3.1.3. Medios de cultivo con dos concentraciones de sacarosa y peptona de colágena como fuente de nitrógeno.

#### 3.1.3.1. Concentración de blastosporas.

En la Figura No. 9, se muestran los resultados obtenidos de la cuenta de blastosporas de *P. fumosoroseus* obtenidas a las 72 horas de fermentación en los medios de cultivo mencionados en el punto 3.1.3, los valores del medio C-1 fueron los más altos ( $9.5 \times 10^9$  blastosporas/mL), mientras que el medio C-2 disminuyó considerablemente a  $3.78 \times 10^9$  blastosporas/mL, al igual que el control ( $3.76 \times 10^9$  blastosporas/mL). A pesar de que se observa una marcada diferencia entre los medios, en el ANOVA se encontró que no existe diferencia significativa entre los datos de los medios. La comparación de medias nos sugiere que ambos medios presentan similitud estadística al medio control; por lo cual ambos medios de cultivo pueden emplearse para estudios posteriores.

#### 3.1.3.2. Estabilidad de almacenaje de las blastosporas.

La Figura No. 10 muestra una comparación de los resultados obtenidos en la viabilidad de las blastosporas de *P. fumosoroseus*, en los medios C-1 y C-2; y observamos que la sobrevivencia al terminar el proceso de fermentación es alrededor del 95% para ambos medios al "0" días. También observamos que el proceso de secado afecta ligeramente la sobrevivencia de las blastosporas al 1er. día (92% en promedio). Posteriormente los extractos fueron almacenados

a 4°C y los datos de ambos medios presentaron un comportamiento similar en la sobrevivencia, así tenemos que a los 180 días (6 meses) de almacenamiento, muestran una disminución hasta el 50% de germinación ambos medios, incluyendo el control.

Se encontró que no existe diferencia significativa entre los medios, (Tabla No. 9). El medio C-1 se consideró el óptimo para extrapolarlo a nivel fermentador; ya que la cuenta de blastosporas/mL y sobrevivencia mostraron mejores resultados para su escalamiento. Por tal motivo el medio de cultivo C-1 se utilizó para la producción de biomasa de *P. fumosoroseus* en el Microfermentador con un volumen de trabajo de 3 L.

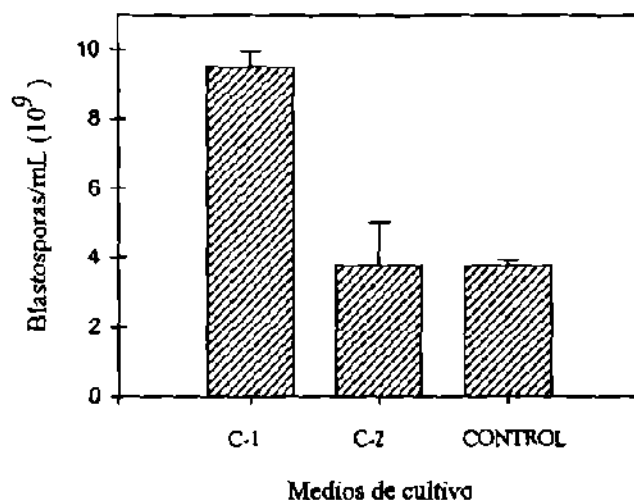


Figura No. 9. Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con sacarosa y peptona de colágena. Las barras representan la desviación estándar de las blastosporas/mL.

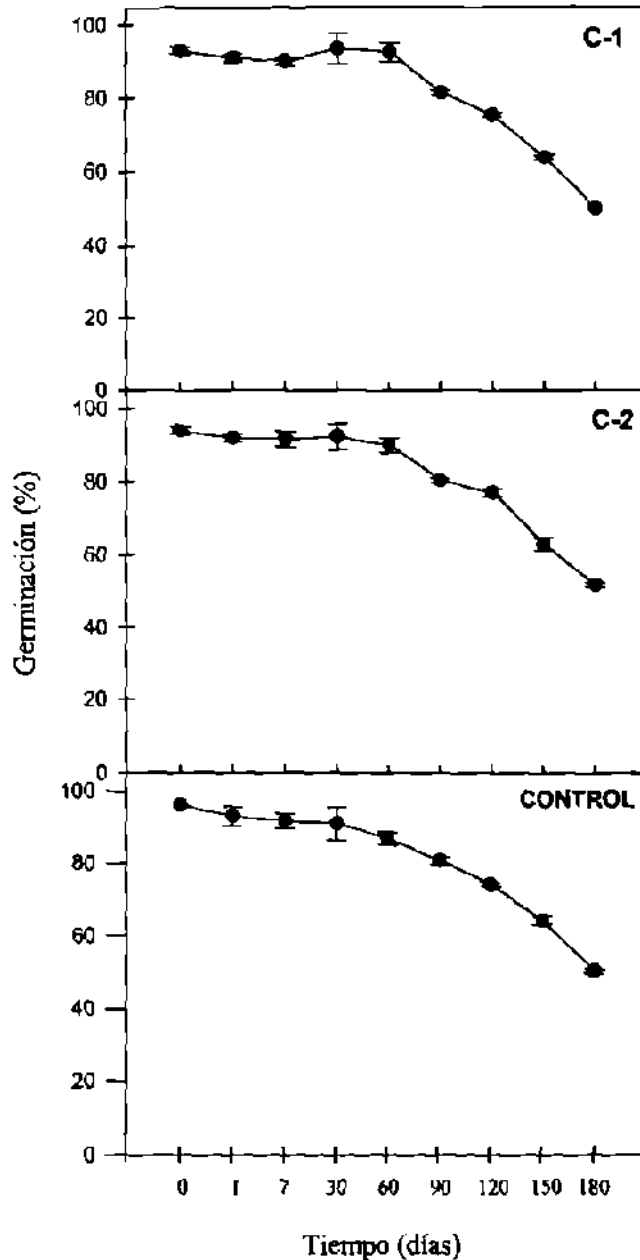


Figura 10. Supervivencia de blastosporas de *P. fumosoreus* producidas en dos concentraciones de sacarosa. Las barras representan la desviación estándar del % de germinación.

**Tabla 9. Supervivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con dos concentraciones de sacrosa.**

| Medios de cultivo |       | Germinación (%)   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |
|-------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                   |       | 0                 | 1                 | 7                 | 30                | 60                | 90                | 120               | 150               | 180               |
| C-1               | Media | 93.0              | 91.0              | 90.0              | 93.3              | 92.1              | 81.3              | 75.3              | 63.7              | 50.0              |
|                   | ± DS  | ±1.0 <sup>a</sup> | ±1.0 <sup>a</sup> | ±1.0 <sup>a</sup> | ±4.0 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±0 <sup>a</sup>   |
| C-2               | Media | 94.0              | 92.0              | 91.7              | 92.3              | 90.0              | 80.3              | 77.0              | 63.0              | 51.6              |
|                   | ± DS  | ±1.0 <sup>a</sup> | ±1.0 <sup>a</sup> | ±2.1 <sup>a</sup> | ±3.5 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±1.0 <sup>a</sup> | ±1.7 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> |
| Control           | Media | 96.0              | 93.0              | 91.7              | 91.0              | 87.0              | 81.0              | 74.3              | 64.3              | 50.3              |
|                   | ± DS  | ±0.0 <sup>a</sup> | ±2.3 <sup>a</sup> | ±2.1 <sup>a</sup> | ±4.5 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±1.0 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> | ±1.6 <sup>a</sup> | ±0.6 <sup>a</sup> |

DS: Desviación estándar.

n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes significativamente entre los medios de cultivo para un día. Tukey P<0.05.

### 3.2. Bioensayos preliminares contra lepidópteros.

La determinación de la mortalidad se realizó con bioensayos sobre larvas de *T. ni*, *S. exigua*, *H. virescens* y *D. sacharalis* a nivel de laboratorio con dieta artificial a base de vitaminas. Las copas con dieta artificial se asperjaron con blastosporas frescas a dos concentraciones:  $1.0 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  blastosporas/mL antes de infestarlas. Las blastosporas frescas se obtuvieron de una fermentación de 3 días con el medio reportado por Jackson *et al.*, 1997 y solamente se filtraron a través de una malla y al sobrenadante se resuspendió en agua destilada a las concentraciones mencionadas anteriormente. Las copas infestadas se incubaron a temperatura ambiente y cada 24 horas se midió la mortalidad, hasta llegar a al 7<sup>o</sup>. día (158 horas). Al terminar se determinó el porcentaje de mortalidad para cada insecto y dosis.

En la Figura No. 11, se observó la eficacia de las blastosporas de *P. fumosoroseus* y en general vemos que las dosis aplicadas mostraron un índice de mortalidad muy bajo, menor del 10%, para los cuatro insectos. Comparando a las dos concentraciones, vemos que  $1 \times 10^8$  blastosporas/mL, aumenta ligeramente el porcentaje de mortalidad. Se recomienda implementar otra técnica de bioensayo; tales como, incrementar la humedad ambiental al 85%, aplicar blastosporas más puras, es decir separarlas por filtración o centrifugación, aplicar blastosporas directamente a los insectos antes de colocarlos en la dieta artificial.

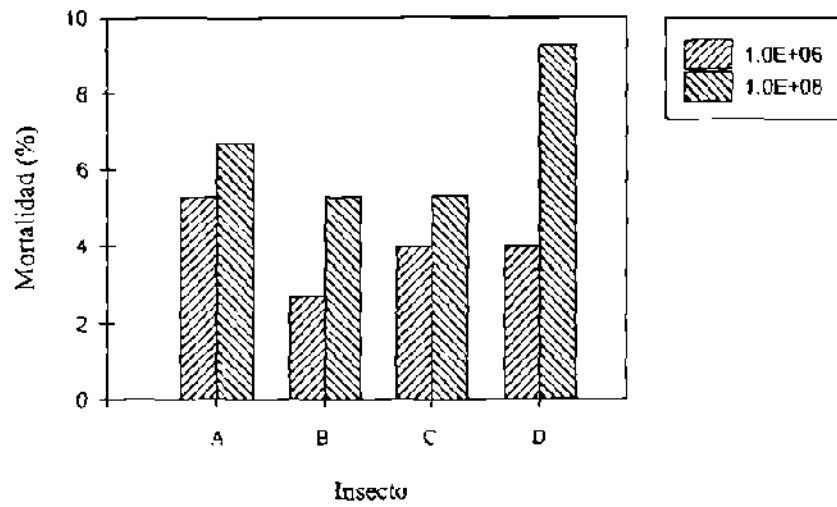


Figura No. 11 . Mortalidad de blastosporas de *P. fumosoroseus* a dos concentraciones contra (A) *H. virescens*, (B) *S. exigua*, (C) *T. ni.* y (D) *D. sacharalis*.

### 3.3. Producción de blastosporas de *P. fumosroseus* a nivel fermentador.

Para la producción de las blastosporas se utilizó el medio C-1 (Tabla No. 5), que contiene 2.0 g de sacarosa y 4.5 g peptona de colágena. Las fermentaciones se realizaron a 250 r.p.m. - 1.0 v.v.m. y 400 r.p.m.-1.5 v.v.m.

#### 3.3.1. Concentración de blastosporas.

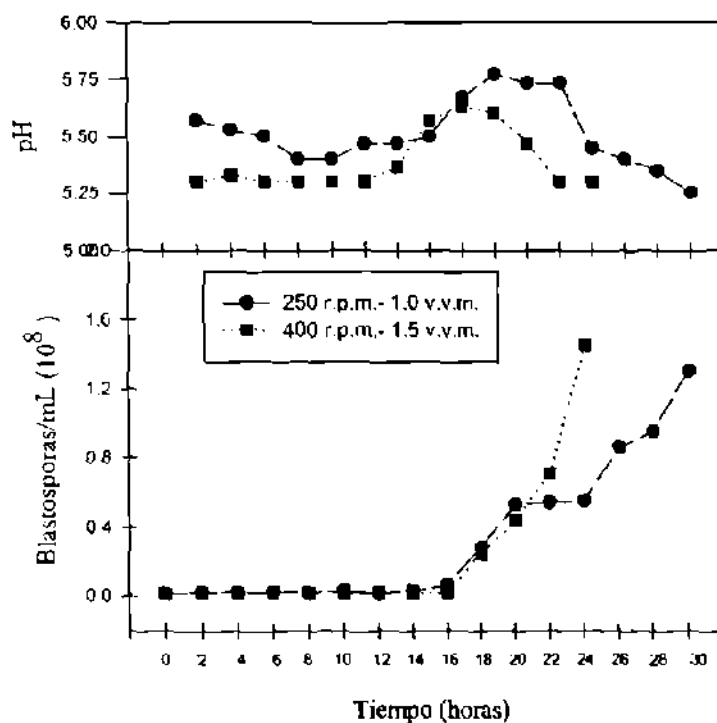
En la Figura No. 12 y Tabla No. 10 se muestran los resultados de la producción de blastosporas y se observó un incremento a 400 r.p.m ( $1.48 \times 10^8$  blastosporas/mL) a las 24 horas de fermentación, sin embargo a 250 r.p.m. el proceso concluyó a las 30 horas y la producción fue de  $1.30 \times 10^8$  blastosporas/mL. En la Figura No. 12 se observa el comportamiento del hongo durante el proceso de fermentación a estas condiciones de agitación y aireación y muestran el crecimiento del hongo a partir de las 20 horas, sin embargo a 400 r.p.m. se incrementa exponencialmente la concentración de blastosporas/mL y concluye a las 24 horas. El crecimiento es más lento a 250 r.p.m. y la producción máxima concluye a las 30 horas.

En la Figura No. 12 se muestra el comportamiento de pH durante el crecimiento del hongo en ambas condiciones de agitación y aireación, y observamos que este valor permanece constante las primeras 12 horas (5.3 a 5.6), después se incrementa ligeramente de las 16 a 18 horas y finalmente disminuye a 5.3 hasta terminar el proceso de fermentación.

**Tabla No. 10.** Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* a nivel fermentador a dos condiciones de agitación.

| Velocidad de agitación<br>(r.p.m.) | Tiempo de fermentación<br>(horas) | Blastosporas/mL ( $10^8$ )<br>Media $\pm$ DS |
|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| 250                                | 30                                | 1.30 $\pm$ 1.5                               |
| 400                                | 24                                | 1.45 $\pm$ 0.6                               |

DS: Desviación estándar, n=3



**Figura No. 12.** Efecto de la agitación y aireación sobre la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus*.



### 3.3.2. Consumo de oxígeno.

La Figura No. 13 muestra el consumo de oxígeno durante el crecimiento de *P. fumosoroseus* a 250 y 400 r.p.m. y observamos un consumo del 60% a las 14 horas de fermentación para ambas condiciones. A 250 r.p.m. permanece ligeramente constante (50%), de las 12 a 20 horas y a partir de este tiempo disminuye a un 5% a las 30 horas. Por el contrario a 400 r.p.m. el consumo de oxígeno es más rápido y a las 24 horas del proceso disminuye hasta un 5%.

### 3.3.3. Viabilidad de las blastosporas.

La viabilidad de los extractos obtenidos a 250 y 400 r.p.m. se muestra en la Figura No. 14, donde se observó valor similar para ambas condiciones en el índice de sobrevivencia de los extractos almacenados a 4°C y temperatura ambiente. Los extractos a 250 r.p.m. presentaron un 60% de viabilidad a los 60 días de almacenamiento a 4°C (Tabla No. 11 y Figura No. 15); mientras que los obtenidos a 400 r.p.m. muestran una disminución en la sobrevivencia hasta el 50%. Por otra parte los extractos recuperados en ambas condiciones de agitación y almacenados a temperatura ambiente disminuyeron la viabilidad hasta el 50% a los 30 días de almacenamiento (Tabla No. 12).

**Tabla No. 11.** Supervivencia de extractos de *P. fumosoroseus* producidos a nivel fermentador y almacenadas a 4°C.

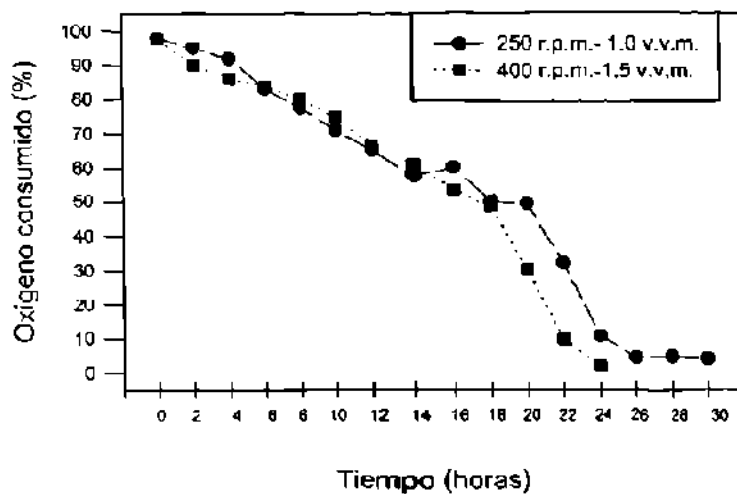
| Velocidad de agitación | % de germinación ± DS (días) |            |            |            |            |
|------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|------------|
|                        | 0                            | 1          | 7          | 30         | 60         |
| 250 r.p.m              | 93.6 ± 2.2                   | 87.3 ± 3.8 | 82.3 ± 2.5 | 72.7 ± 2.5 | 65.3 ± 3.2 |
| 400 r.p.m.             | 95.3 ± 1.2                   | 88.0 ± 2.0 | 81 ± 2.6   | 71.3 ± 3.2 | 54 ± 2.6   |

DS: desviación estándar, n=3

**Tabla No. 12.** Supervivencia de extractos de *P. fumosoroseus* producidos a nivel fermentador y almacenadas a temperatura ambiente.

| Velocidad de agitación | % de germinación ± DS (días) |            |            |            |
|------------------------|------------------------------|------------|------------|------------|
|                        | 0                            | 1          | 7          | 30         |
| 250 r.p.m              | 93.7 ± 2.1                   | 82.3 ± 2.5 | 73.0 ± 2.6 | 56.0 ± 2.0 |
| 400 r.p.m.             | 95.6 ± 1.2                   | 78.0 ± 4.4 | 59.0 ± 2.0 | 45.0 ± 2.0 |

DS: desviación estándar, n=3



**Figura 13.** Efecto de la agitación y aireación sobre el consumo de oxígeno en la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* a 250 y 400 r.p.m.

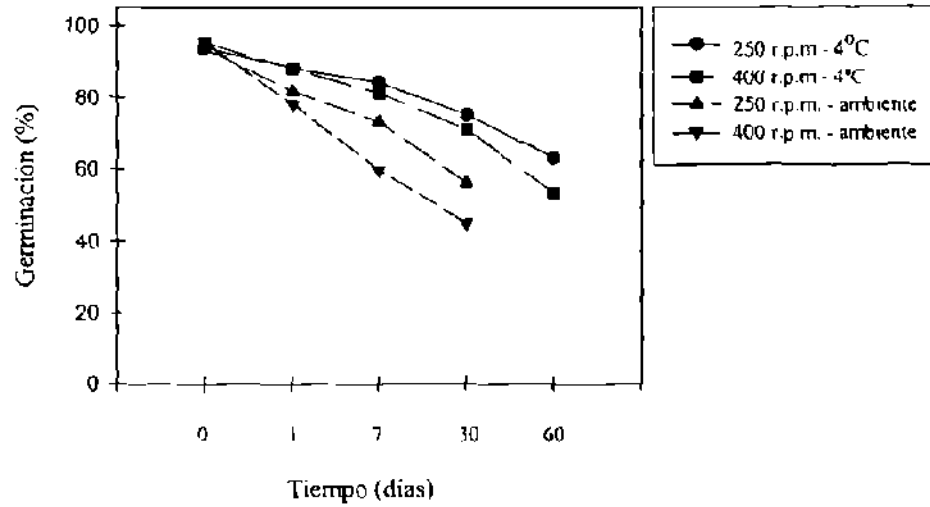


Figura No. 14. Comparación de velocidad de agitación y almacenamiento en la sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas a nivel fermentador.

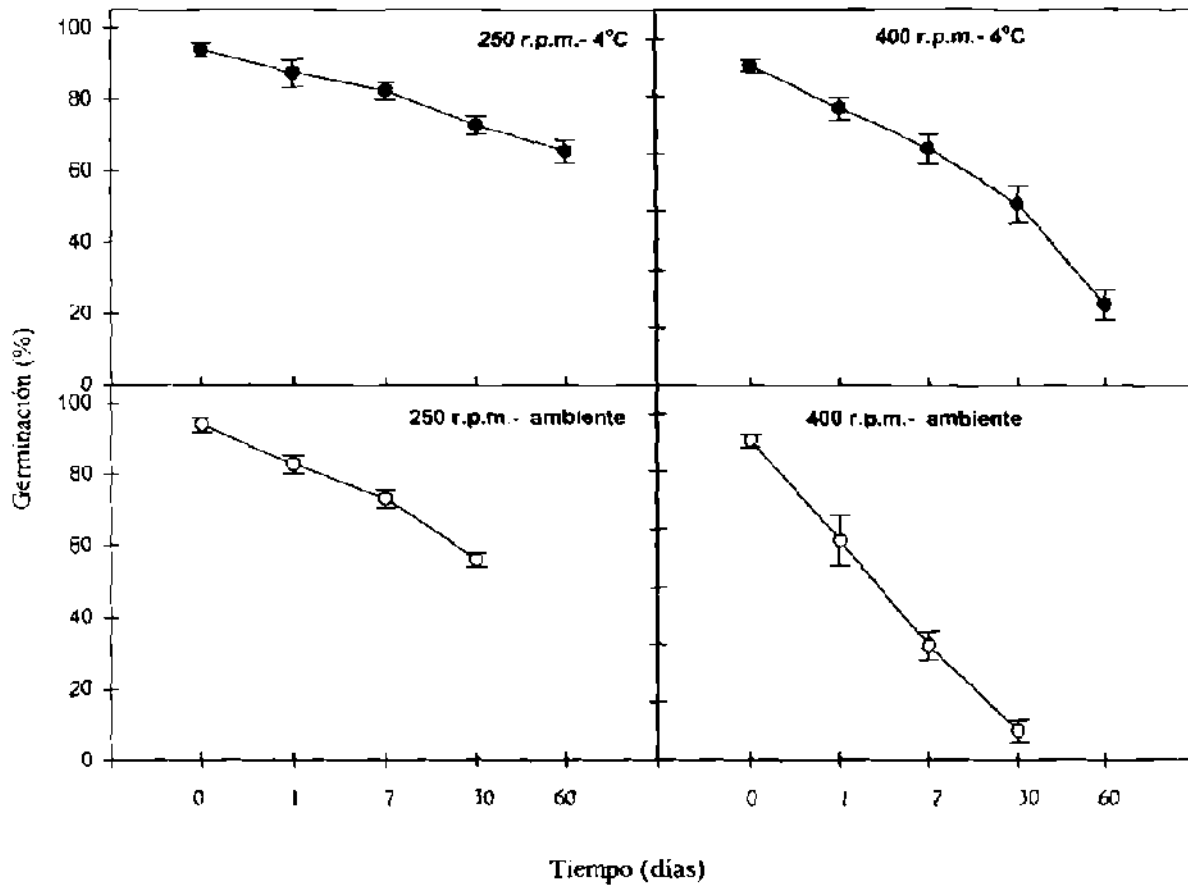


Figura No. 15. Sobrevivencia de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en dos condiciones de agitación y almacenamiento. Las barras representan la desviación estándar del % de germinación.

## DISCUSIÓN

Las formulaciones con blastosporas del hongo entomopatógeno *P. fumosoroseus* se dificultan al producirlas en medios de cultivo líquidos debido a que disminuye la sobrevivencia en un periodo corto. En este trabajo se incrementó la viabilidad de los extractos producidos a nivel de matraz en el medio de cultivo a base de sacarosa como fuente de carbono y peptona de colágena como fuente de nitrógeno hasta los 6 meses de almacenamiento a 4°C, lo cual representa una alternativa en la producción de *P. fumosoroseus* a gran escala.

Se utilizaron medios de cultivo líquidos para producir blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr- 612), debido a que proporcionan mayores ventajas que los medios de cultivo sólidos y esto concuerda con Samson, *et al.*, 1988, quien describe que en fermentaciones líquidas los parámetros pueden ser controlados mediante computadoras automatizadas, la producción es rápida, reducción de problemas de contaminación, sin embargo el tipo de propágulo formado puede no estar disponible para la subsecuente aplicación en campo. Para la producción de las blastosporas de *P. fumosoroseus* de esta investigación se utilizaron medios de cultivo a base de sacarosa a diferentes concentraciones como fuente de carbono y harina de soya o peptona de colágena como fuente de nitrógeno (Tabla No. 5). En esa parte se cumplió el objetivo No. 1 y No.2, se diseñaron diferentes medios de cultivo líquidos y en cada uno se

determinaron blastosporas/mL de *P. fumosoroseus*. Las concentraciones de sacarosa que produjeron mayores rendimientos en la producción de blastosporas a nivel matraz respecto al resto de los medios de cultivo fueron: medio B-1 (8.0 %) y 3.8 % de harina de soya, produjeron  $1.12 \times 10^9$  blastosporas/mL y medio C-1 (2.0 %) y 4.5 % de peptona de colágena produjeron  $9.5 \times 10^9$  blastosporas/mL (Figura No. 3 y No. 6, respectivamente). Estudios similares se realizaron utilizando fuentes complejas de nitrógeno y de carbono en la formulación de los medios de cultivo, y observaron que las fuentes complejas de carbono favorecen la producción de micelio, mientras que el empleo de azúcares puros, tales como sacarosa y dextrosa, forman blastosporas principalmente. (Eyal et al, 1994) En base a este principio, se produjeron fermentaciones en un medio de cultivo que contenía 80 g/L glucosa, 13.2 g/L casaminoácidos y 9 vitaminas, a partir de una concentración inicial de  $5 \times 10^4$  conidias/mL, se obtuvieron  $5.8 \times 10^8$  blastosporas/mL en un período de 3 días. (Jackson, 1999; Jackson, et al., 1997) En otros estudios utilizaron un medio de cultivo de bajo costo a base de glucosa (20 g/L), peptona de caseína (10 g/L) y extracto de levadura (2 g/L), y obtuvieron más de  $3 \times 10^8$  blastosporas/mL durante la fermentación y concluyen que la producción podría ser limitada por el agotamiento de la fuente de nitrógeno. (López, et al., 2000) Otros investigadores realizaron un proceso de fermentación bifásica, utilizaron medios de cultivo con salvado de trigo y produjeron conidias de *B. bassiana* con baja producción de biomasa. Sin embargo, más del 95% de las conidias germinaron en pruebas de viabilidad

después de más de tres años de almacenamiento a 4° C. (Rombach, M. C. 1989) En otro estudio se produjeron blastosporas con el medio de cultivo básico ("Medio París") pero con baja proporción C:N (10 g/L glucosa y 5 g/L de extracto de levadura) y en medios de cultivo diseñados para la producción de conidias de *B. bassiana* con alta proporción C:N reportaron estructuras en forma de conidias cuando cultivaron *P. fumosoroseus*. (Vidal et al., 1998) Desde 1966, producen blastosporas de *B. Bassiana* en medios de cultivo sumergido con la siguiente composición: 2.5 % glucosa, 2.5 % almidón, 2.0 % de líquido de remojo de maíz, 0.5 % Na Cl y 0.2 % CaCO<sub>3</sub> a un pH de 4.5 y se obtuvieron rendimientos de 68.7 mg/mL de materia seca y 6.43 x 10<sup>8</sup> blastosporas /mL después de 72 h de fermentación. (Samsinakova, 1966) Otro estudio similar fue realizado por Latgé, et al., 1986 con un medio de cultivo a base de glucosa y extracto de levadura produjo 1 x 10<sup>9</sup> blastosporas/mL de *B. bassiana*. Recientemente se cultivaron conidias y esporas de *B. bassiana* provenientes de un aislamiento de la colección de cepas de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, en medio líquido con la siguiente composición (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno, melaza como fuente de carbono y (KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>) como fuente de potasio. Con este medio de cultivo obtuvieron 2.476 g de biomasa/L de medio y 2.256 x 10<sup>7</sup> esporas/mL. (García, G. et al., 1997)

Los medios de cultivo que contenían la harina de soya presentaron buenos resultados en la producción de blastosporas (Figura No. 3), pero esta



fuerza de nitrógeno fue descartada por el contenido de componentes insolubles, esto incrementa los procedimientos para eliminarlos y por lo tanto el costo en la producción de la biomasa. Se probó la peptona de colágena (Figura No. 6) que favoreció la producción de biomasa, al igual que el estudio realizado por Rivas, 1998.

Después de determinar el medio de cultivo óptimo C-1 con 2 % de sacarosa y 4.5 % de peptona de colágena a nivel matraz (Tabla No. 5), se seleccionó este medio de cultivo para la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en fermentadores de 5 L, con un volumen de trabajo de 3 L. Además de los constituyentes en un medio de cultivo, las condiciones de fermentación contribuyen a la producción y sobrevivencia de las blastosporas. Se probaron dos condiciones de agitación y se encontró que la mejor producción fue a 400 r.p.m con una producción de  $1.45 \times 10^8$  blastosporas/mL a las 30 horas de fermentación (Tabla No. 10). Esto concuerda con De la Torre y Cárdenas Cota, 1996, que reportaron primero la producción de conidias en cultivo sumergido en fermentadores de 6 L (4-L V<sub>D</sub>), una concentración de  $1 \times 10^8$  conidias/mL de *P. fumosoroseus*, en un medio de cultivo con la siguiente composición: una fuente simple de carbono: glucosa (30 g/L) y una fuente simple de nitrógeno: nitrato de amonio (0.7 g/L) suplementada con extracto de levadura (1 g/L); altas relaciones carbono-nitrógeno (C:N) se requieren para producir conidias sumergidas. Con esto se cumple el objetivo No. 4, referente a la producción de blastosporas a nivel

fermentador en el medio de cultivo a base de sacarosa y peptona de colágena, se determinó la cinética de crecimiento a diferentes condiciones de agitación y aireación.

En esta investigación, las blastosporas de *P. fumosoroseus* fueron secadas por aire con tierra de diatomeas y el medio C-1 presentó mayor índice de sobrevivencia cuando fue almacenado a 4 °C durante 6 meses (Figura No. 10). Esto lo confirma Samson, *et al.*, 1988c; las temperaturas inferiores (4 a 5°C) son necesarias para un almacenamiento mayor a largo plazo, aunque están costosas; por ejemplo, bajo estas condiciones las esporas de *V. lecanii*, *H. thompsonii* y *C. obscurus* permanecen viables al menos durante un año. Otros trabajos relacionados fueron reportados con blastosporas secadas por aire durante una noche, hasta obtener 1-5 % (w/w) de humedad bajo un contenedor biológico (25% a 40% aire relativamente húmedo) mostraron una viabilidad inicial buena, pero una baja estabilidad (30 % de sobrevivencia a 4°C después de 30 días). Sin embargo en los viales secados por congelación, y almacenado al vacío; la sobrevivencia fue de 95 % a los 30 días y 68% a los 150 días cuando fueron almacenadas a 4°C. Desafortunadamente, la sobrevivencia de las blastosporas cayó a 1 % después de 30 días cuando se almacenaron a 22°C. (Jackson, *et al.*, 1997) Resultados similares se encontraron en las blastosporas obtenidas a nivel fermentador, la sobrevivencia disminuyó al 50 % a los 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Tabla No. 12 y Figura No. 15) Esto lo confirma Samson, *et al.*, 1988, a temperatura ambiente,

la mayoría de los hongos pierden su viabilidad rápidamente en menos de un mes, además las condiciones de secado y almacenamiento contribuyen a la viabilidad de blastosporas de *P. fumosoroseus*, este es un problema clave para las preparaciones industriales con hongos entomopatógenos, los cuales necesitan ser almacenados al menos por un año sin perder su sobrevivencia. Thomas, *et al.*, 1987, determinó que las blastosporas tienen un corto tiempo de vida y no sobreviven a condiciones ambientales adversas. Por otra parte Rombach, M. C. 1989 y Jackson *et al.*, 1997 determinaron que las blastosporas producidas por varios hongos entomopatógenos son más largas que las conidias aéreas, no son sensibles a técnicas de secado simple y tienden a perecer más rápidamente durante el almacenamiento. Más adelante, Wraight, S. P. *et al.*, 1998, observaron que el almacenamiento de conidias de *P. fumosoroseus* en un polvo seco es altamente estable a 4° C, por ejemplo, la viabilidad de estas conidias producidas por Mycotech no fue significativamente diferente después de 22 meses de almacenamiento. AGROBIONSA almacena conidias mezcladas con tierra de diatomeas a 4 °C por más de 6 meses antes de que salgan al Mercado, por lo tanto no hay pérdidas.

Los objetivos No. 3 y No. 5 se cumplieron al evaluar la sobrevivencia a diferentes intervalos de tiempo (1, 7, 30, 60, 90 y 120 días) a los productos obtenidos con los diferentes medios de cultivo formulados: a nivel matraz hasta los 6 meses y a nivel fermentador solamente sobrevivieron hasta los 2 meses de almacenamiento.

Más recientemente, Cliquet S. and M. A. Jackson, 1997, evaluaron tres métodos de secado y evaluaron la tolerancia a la desecación de blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en medios de cultivo líquido. Las blastosporas se mezclaron con sílica gel, arena y tierra de diatomeas, la sobrevivencia de las blastosporas después de secado fue 19 %, 82% y 2% para la sílica gel, arena y tierra de diatomeas, respectivamente. Lo anterior se confirma en este estudio, las blastosporas secadas por aire con tierra de diatomeas mostraron una viabilidad de 90 a 95% después del secado (1er. día), Tabla No. 9, No. 11 y No. 12. Un trabajo similar fue el de Stephan and Zimmermann, 1998, que utilizaron leche descremada en polvo y azúcar de remolacha como protectores de secado, y las blastosporas presentaron una viabilidad de 82.5 % a 88.7 %, pero no reportaron estabilidad al secado de blastosporas. La germinación de las esporas secadas por spray disminuyó en comparación con las esporas sumergidas recién cosechadas, esto podría reducir la ventaja de las blastosporas sobre las conidias aéreas.

A diferencia a lo que nosotros observamos en bioensayos contra diferentes insectos lepidópteros: *T. ni*, *S. exigua*, *D. sacharalis* y *H. virescens* que el índice de mortalidad es inferior al 10 % (Figura No. 11), lo cual puede deberse a que *P. fumosoroseus* no afecta estos insectos o la técnica de aplicación de las blastosporas no fue la adecuada. Otro investigador (Fargues *et al.*, 1994) comparó la actividad patogénica de diferentes propágulos de *P. fumosoroseus* y encontraron que los cuerpos de hifas fueron los más patogénicos a *Spodoptera frugiperda*, seguidos por las conidias germinadas y finalmente conidias aéreas (61%, 46% y 29% de mortalidad respectivamente). Estos bioensayos se realizaron con una alta humedad relativa y protegidas de la exposición de Rayos Ultravioleta, sin embargo estas condiciones no siempre son reproducibles en campo abierto. Por otro lado, se ha hipotetizado que la alta virulencia de los propágulos vegetativos es causada por tiempos de germinación más cortos. Bajo condiciones de campo, los requerimientos de humedad representan una significativa restricción para la eficacia del biocontrol, la rápida germinación producida por blastosporas en cultivos líquidos debería aumentar la capacidad de éstos propágulos para infectar y matar *B. argentifolii* y otros insectos plaga susceptibles (Fargues, *et al.*, 1994; Jackson, *et al.*, 1997). Otro estudio fue reportado por Rombach, 1989, quien observó que la virulencia de los cuerpos de las hifas es baja comparada con las conidias aéreas. Por otra parte, Vandenberg, *et al.*, 1998, comparó la eficacia de conidias aéreas de *P. fumosoroseus* y blastosporas frescas secadas contra *D.*

*Noxia* y concluye que las blastosporas preparadas en fresco y secadas al aire o secadas por congelación son al menos tan eficaces como las conidias aéreas.

Algunos de los logros más importantes de este trabajo son los siguientes:

- Proponemos un medio de cultivo líquido para la producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* estables al almacenamiento.
- Encontramos que la mejor condición a nivel fermentador, a 400 r.p.m es más factible porque la producción de las blastosporas se produce en menor tiempo.
- El medio de cultivo a base de sacarosa y peptona de colágena disminuye los costos de producción de blastosporas de *P. fumosoroseus*.

La hipótesis inicial se cumplió, por el hecho de haber producido blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo líquidos a base de sacarosa y peptona de colágena, los cuales mejoraron la concentración y sobrevivencia hasta 6 meses.

## CONCLUSIONES

- El medio de cultivo, formulado con 8 % de sacarosa y 3.8 % de harina de soya (B-1) presentó una mayor producción de blastosporas a nivel matraz ( $11.2 \times 10^8$  blastosporas/mL), mientras que los medios de cultivo B-1, B-2, B-3 y B-4 mostraron viabilidades similares a los 4 meses de almacenamiento (66 a 74% de germinación).
- El medio de cultivo formulado con 4.5 % de peptona de colágena y 2 % de sacarosa (C-1) mostró una concentración de  $9.5 \times 10^9$  blastosporas/mL y a los 180 días (6 meses) de almacenamiento a 4°C con una sobrevivencia del 50 %.
- La eficacia de las blastosporas de *P. fumosoroseus* producidas en el medio de cultivo control presentaron un índice de mortalidad menor al 10%, *D. sacharalis*, *T. ni*, *S. xigus* y *H. virescens*.
- El producción de blastosporas a nivel fermentador se incrementó a 400 r.p.m ( $1.48 \times 10^8$  blastosporas/mL) en 24 horas, y a 250 r.p.m. el proceso concluyó a las 30 horas y la producción fue de  $1.30 \times 10^8$  blastosporas/mL.
- Los productos obtenidos a 250 r.p.m. presentaron un 60% de germinación a los 60 días de almacenamiento a 4°C y a 400 r.p.m. un 50% en las mismas condiciones. Mientras que los extractos de ambas condiciones de agitación y almacenados a temperatura ambiente disminuyeron la viabilidad hasta el 50% a los 30 días de almacenamiento.

## RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos contra la mosca blanca (*B. tabaci*) con las blastosporas obtenidas de los diferentes medios de cultivo.
- Probar otros medios de cultivo con diferentes relaciones C:N para seleccionar la concentración óptima del medio seleccionado.
- Estandarizar los bioensayos contra: *D. sacharalis*, *T. ni*, *S. exigus* y *H. virescens*, considerando humedad ambiental y forma de aplicación, para evaluar la actividad biológica.
- Aislar cepas nativas de *P. fumosoroseus*, a partir de suelo de nuestra región, para probarlas con los medios de cultivo óptimos encontrados.
- Probar diferentes condiciones de secado para incrementar la sobrevivencia de las blastosporas de *P. fumosoroseus*.
- Variar las condiciones de agitación y aireación para encontrar las condiciones óptimas del proceso a nivel de fermentador.
- Para la producción de *P. fumosoroseus* establecer una cría de mosca blanca en nuestra facultad, para tener material biológico y realizar los bioensayos.



## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, C., Pujol, I., Sala, J. and J. Guarro. 1998. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42: 1601-1604
- Agudelo, F. and L. Falcon. 1983. Mass production, infectivity and field application studies with the entomogenous fungus *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology. 42: 124-132
- Alves, S.B. y R. M. Pereira. 1989. Production of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok and *Beauveria bassiana* (Bals). Vuill in plastic trays. Ecosistema, 14: 188-192
- Badii, M. H., Flores, A. E. y L. J. Galán Wong. 2000. Fundamentos y perspectivas de control biológico. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Pág: 325-338.
- Boucias, D. J. y J. C. Pendlan. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticule: the initial event of mycosis in arthropod host. Pp. 101-128. En G. T. Cole y H. C. Hoch (eds.). The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum, Nueva York.
- Bradley, C., Black, W., Kearns, R. y P. Woods. 1992. The role of production technology in mycoinsecticide development. En:

G.Leatham (ed.). *Frontiers in Industrial Micology*. Mycological Society of America. Symposium on Industrial Mycology.

Campbell, R. K., Barnes, G. L., Cartwright, B. O. and Eikenbary. 1983. Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 41: 117-121

Castillo, T. J. 1987. *Micología General*. Editorial Limusa. Dirección General de Institutos Tecnológicos. pp:40-41

Charnley, A. K. 1994. Host invasion by insect pathogenic fungi. "VI International Colloquium on invertebrate pathology an microbial control and II International Conference on *Bacillus thuringiensis*. Montpellier, France, August 28 - September 2. pp:31-37

Cliquet, S. and M. A. Jackson. 1997. Comparison of air-drying methods for evaluating the desiccation tolerance of liquid culture-produced blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 13: 299-303

- De la Torre, M. y H. M. Cárdenas Cota. 1996. Production de *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. *Entomophaga* 41: 443-453
- Deacon, J. W. 1984. Aspect of Microbiology 7: microbial control of plant pests and diseases. Van Nosttrand Reinhold. UKO Co. Ltd. pp:31-42
- Eyal, J., Walter, J. F., Osborne, L. and Z. Landa. 1994. Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. U.S. Patent 5,360,607
- Fargues, J., Maniania, N. K. and J. C. Delmas. 1994. Leaf consumption of the colorado potato beetle (Coleoptera:Chrysomelidae) infected with the entomopathogens, *Beauveria bassiana*. *Journal of invertebrate Pathology*. 64: 173-178
- Feng, M. G., Poprawski, T. J. and G. G. Khachatourians. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: currents status. *Biocontrol Science and Technology*. 4:3-34

- Frost and Sullivan. 1990. Biopesticides: A technology impact report, Frost & Sullivan Inc. New York, N. Y. pp: 1-341
- Gabriel, C. J. and C. R. Cook. 1990. Biological control the need for a new scientific framework. *Bio/Science*. 40:204-207.
- García, G. C., Hernández, V. V., Segovia, V. e H. Medrano. 1997. Producción de conidia - esporas de *Beauveria bassiana* en medios líquido y su evaluación en larvas de *Epilachna varivestis*. XX Congreso Nacional de Control Biológico, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp:37- 38
- Garza, E., Berlanga, A. y V. M. Hernández. 1994. Guía técnica. Producción de hongos entomopatógenos. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Tecoman, Colima, México
- Goettel, M. S. 1984. A simple method for mass culturin entompathogenic Hyphomycete fungi. *J. Microbial Meth.* 3: 15-20.
- Hajek, A. E. y R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 293-322.

- Humphreys, A. M., Matewele, P., Cunliffe, B. and A. P. J. Trinci. 1990. Comparison of sporulation of *Paecilomyces farinosus* and *Beauveria bassiana* in batch and fed-batch culture. *Mycological Research*. 94:1046 – 1050
- Ignoffo, C. M. and W. F. Hink. 1971. Propagation of arthropod pathogens in living systems in: *Microbial control of insects and mites*. Burges, H. D., N. W. Hussey (eds.) Academic Press. New York, N. Y.
- Inch, J. M. M., Humphreys, A. M., Trinci, A. P. and A. T. Gillespie. 1986. Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Trans. Br. Mycol. Soc.* 87:215-222
- Jackson, M. A. 1999. Method for producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. U.S. Patent 5,968,808
- Jackson, M. A., McGuire, M. R., Lacey, L. A. and S. P. Wraight. 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*. 95: 1 – 7

- Johnson, M. J. y J. Borkowsky. 1964. Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. *Biotechnol. and Bioeng.* 6:457-463
- Jones, K. A. 1994. Registration and use of microbial insecticides in developing countries. "VI International Colloquium on invertebrate pathology and microbial control. Montpellier, France, August 28 - September 2. pp:82-88
- Khachatourians, G.G. 1986. Production and use of biological pest control agents. *Tibtech*, 120-124
- Lacey, L. A., Kirk, A. A. and R. D. Hennesseey. 1993. Foreign exploration for natural enemies of *Bemisia tabaci* and implementation in integrated control programs in United States. A.N.P.P. Third International Conference on Pests in Agriculture, Montpellier, France. pp:351 - 360
- Landa, Z. L., Osborne, F., López and J. Eyal. 1994. A bioassay for determining pathogenicity of entomogenous fungi on whiteflies. *Biological Control.* 4:341-350
- Lane, B. S., Trinci, A. P. J. and A. T. Gillespie. 1991a. Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested

from carbon and nitrogen-limited batch cultures. *Mycological Research*. 95: 821 – 828

Lane, B. S., Trinci, A. P. J. and A. T. Gillespie. 1991b. Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycological Research*. 95: 829 – 833

Latge, J. P., Jall, R. A., Cabrera, R. L. And J. C. Kerwin. 1986. Liquid fermentation of entomopathogenic fungi. In "Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology" eds. Samson, R. A., Vlack, J. M. and D. Peters. Fourth International Colloquium of Invertebrate Pathology, Wageningen, Netherlands.

Latgé, J.P. y R. Moletta. 1988. *Biotechnology*. Pp. 152-164. En: *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag. New York, N.Y.

Li, Y. W. y J. H. Yang. 1988. Prospects for the use of entomogenous fungi against forest pest. Pp. 10-14. En: Y.W. Li, Z.Q. Liang, J.W. Wu, Z.K. Wu y Q.F. Xu (eds.). *Study and Application of Entomogenous Fungi in China*. Vol. 1. Academic Periodical Press Beijing.

- Lisansky, S. 1989. Biopesticides: The next revolution?. *Chemistry and Industry*, 478-482.
- Lisansky, S. G. and R.A. Hall. 1983. In. *The Filamentous Fungi 4* (de J.E. Smith, D.R. Berry & B. Kristiansen), London: Edward Arnold. pp:327-345.
- López-y-López, E. V., Chavarría-Hernández, N., Fernández Sumano, P. y M. de la Torre. 2000. Fermentation process for bioinsecticide production. An overview. *Recent Res. Devel. Biotech. & Bioeng.* 3:20.
- Lorence, Q. A. 1996. Los biopesticidas en el marco de la agricultura sustentable. Cuadernos de vigilancia tecnológica, Cambiotec. UNAM. México. pp:39-43
- Osborne, L. S. and Z. Landa. 1992. Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomologist.* 75:456 – 471
- Osborne, L. S., Storey, G. K., McCoy, C. W. and J. F. Walter. 1990. Potential for controlling the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, with the fungus, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Proceedings of the 5 International Colloquium on the Invertebrate Pathology and the*



Microbial Control. Adelaide Australia. 20 - 24 August, 1990.  
pp:386

Rajnachapel-Messaï, J. 1990. Les biopesticides. Biofutur. Juillet-Août: 23-24.

Rivas Morales, C. 1998. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUGEL-1 A a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolíticas. Tesis de Doctorado con especialidad Biotecnología. Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L.

Rodríguez, M. M., Martínez, M. de la T. y E. U. Niembro. 1991. *Bacillus thuringiensis*: características biológicas y perspectivas de producción. Rev. Lat. Am. Microbiol. 33:279-292.

Rombach, M.C., R.M. Aguda y D.W. Roberts. 1988. Storing dry *Beauveria bassiana* mycelium. International Rice Research Newsletter. 13: 37-38.

Rombach, M. C. 1989. Production of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) sympodulconidia in submerged culture. Entomophaga, 34: 45-52.

- Samsinakova, A. 1966. Growth and sporulation of submerged cultures of the fungus *Beauveria bassiana* in various media. *Journal of Invertebrate Pathology*. 8: 395-400
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. In "Studies in Mycology". Vol 6 Baarn. The Netherlands.
- Samson, R.A., Evans, H.C. and J. P. Largé. 1988a. Atlas of entomopathogenic fungi. De Spriger-Verlag. 1-72.
- Samson, R.A., Evans, H.C. y J.P. Latgé. 1988b. Taxonomy of Entomopathogenic Fungi. Pp. 5-16. En: Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag. Nueva York, N. Y.
- Samson, R.A., Evans, H.C. y J.P. Latgé 1988c. Biological control: past, present and future. Pp. 165-172. En: Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer-Verlag. New York, N.Y.
- Smith, P. 1993. Control of *Bemisia tabaci* and the potencial of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News an Information*. 14: 71-78

- Soper, R.S. y M.G. Ward. 1981. Production, formulation and application of fungi for insect control. Pp. 161-180. En: G. C. Papavizas (ed.), Biological Control in Crop Production. Symposium No.5 Osmum Totowa.
- Stephan, D. and G. Zimmermann. 1998. Biocontrol Science and Technology. 8: 3-11
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G. and W. M. Ingledew. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia in submerged culture. Canadian Journal of Microbiology. 33: 12-20
- Tigano-Milani, M. S.; Faria, M. R.; Martins, I. and R. E. Leucona. 1963. Ocurrência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Soroke *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brasil. An. Soc. Entomol. Brasil. 22:391-393
- Tilton, H. 1993. Biopesticides have 5% market share of 7.8 billion dollars chemical insecticides market. Chemical Marketing Reporter, Mayo 17, p:SR11

- Valenzuela, L. E. 1987. Microorganismos entomopatógenos: su aprovechamiento en el control de insectos plaga. (1era. ed.) Edición Silva Castillejo. México. pp:15-26.
- Vandenberg, J. D. 1996. Standardized bioassay and screening of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) *Journal of Economic Entomology*. 89: 1418-1423.
- Vandenberg, J. D., Jackson, M. A. and L. A. Lacey. 1998. *Journal of Invertebrate Pathology*. 72: 181-183
- Vidal, C., Fargues, J., Lacey, L. A. and M. A. Jackson. 1998. Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule, production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathologia*, 143: 33-46
- Vidal, C., Lacey, L. A. and J. Fargues. 1997. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) with a description of a bioassay method. *J. Econ. Entomol.* 90: 765-772.

Wraight, S. P., Carruthers, R. I., Bradley, C. A., Jaronski, S. T., Lacey, L. A., Wood, P. and S. Galaini-Wraight. 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 217-226

## ABREVIATURA Y SÍMBOLOS

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ANOVA                           | Análisis de Varianza                            |
| ARS                             | Agriculture Research Service                    |
| blast                           | Blastosporas                                    |
| °C                              | Grados centígrados                              |
| Cols.                           | Colaboradores                                   |
| CaCl <sub>2</sub>               | Cloruro de calcio                               |
| conidias/mL                     | Conidias sobre mililitro                        |
| conidias/g                      | Conidias sobre gramo                            |
| C:N                             | Relación carbono nitrógeno                      |
| LC <sub>50</sub>                | Concentración letal media                       |
| LD <sub>50</sub>                | Dosis letal media                               |
| LT <sub>50</sub>                | Tiempo letal medio                              |
| Esp/mL                          | Esporas sobre mililitros                        |
| F. cal                          | Prueba de F calculada                           |
| FeSO <sub>4</sub>               | Sulfato ferroso                                 |
| g/mL                            | Gramos sobre mililitro                          |
| g                               | Gramos  |
| g/L                             | Gramos sobre litro                              |
| hrs                             | Horas   |
| Kda                             | Kilodalton                                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | Fosfato Potasio                                 |
| Mg SO <sub>4</sub>              | Sulfato de Magnesio                             |
| mg/mL                           | Miligramos sobre mililitro                      |
| mL                              | Mililitro                                       |
| μL                              | Microlitros                                     |
| mm <sup>3</sup>                 | Milimetro cúbico                                |
| mm <sup>2</sup>                 | Milimetro cuadrado                              |
| NS                              | No hay diferencia significativa                 |
| P. error                        | Probabilidad de error                           |
| V/V                             | Volumen por volumen                             |
| v.v.m.                          | Volumen de aire por volumen de medio de cultivo |
| %                               | Por ciento                                      |
| USDA                            | United States Departament of Agriculture        |
| r.p.m.                          | Revoluciones por minuto                         |

### Apéndice No. 1.

Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con diferente concentración de sacarosa y harina de soya.

| Medios de cultivo | Blastosporas/mL $\pm$ DS ( $10^8$ ) |
|-------------------|-------------------------------------|
| A-1               | $7.0 \pm 1.5^{ab}$                  |
| A-2               | $4.8 \pm 2.3^a$                     |
| A-3               | $3.7 \pm 0.8^a$                     |
| A-4               | $4.0 \pm 0.2^a$                     |
| Control           | $8.9 \pm 1.1^b$                     |

DS: Desviación estándar. n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes significativamente. Tukey P<0.05.

### Apéndice No.2

Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus* en medios de cultivo con diferente concentración de harina de soya y sacarosa.

| Medios de cultivo | Blastosporas/mL $\pm$ DS ( $10^8$ ) |
|-------------------|-------------------------------------|
| B-1               | 11.2 $\pm$ 4.4 <sup>c</sup>         |
| B-2               | 3.00 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>         |
| B-3               | 6.37 $\pm$ 2.57 <sup>a,b,c</sup>    |
| B-4               | 4.42 $\pm$ 0.8 <sup>a,b</sup>       |
| B-5               | 4.83 $\pm$ 0.2 <sup>a,b,c</sup>     |
| Control           | 10.1 $\pm$ 0.2 <sup>b,c</sup>       |

---

DS: Desviación estándar. n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes significativamente.  
Tukey P<0.05.



### Apéndice No. 3.

Producción de blastosporas de *P. fumosoroseus*  
en medios de cultivo con sacarosa en dos concentraciones.

| Medios de cultivo | Blastosporas/mL $\pm$ DS ( $10^9$ ) |
|-------------------|-------------------------------------|
| C1                | 9.5 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>         |
| C2                | 3.78 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>         |
| Control           | 3.76 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>         |

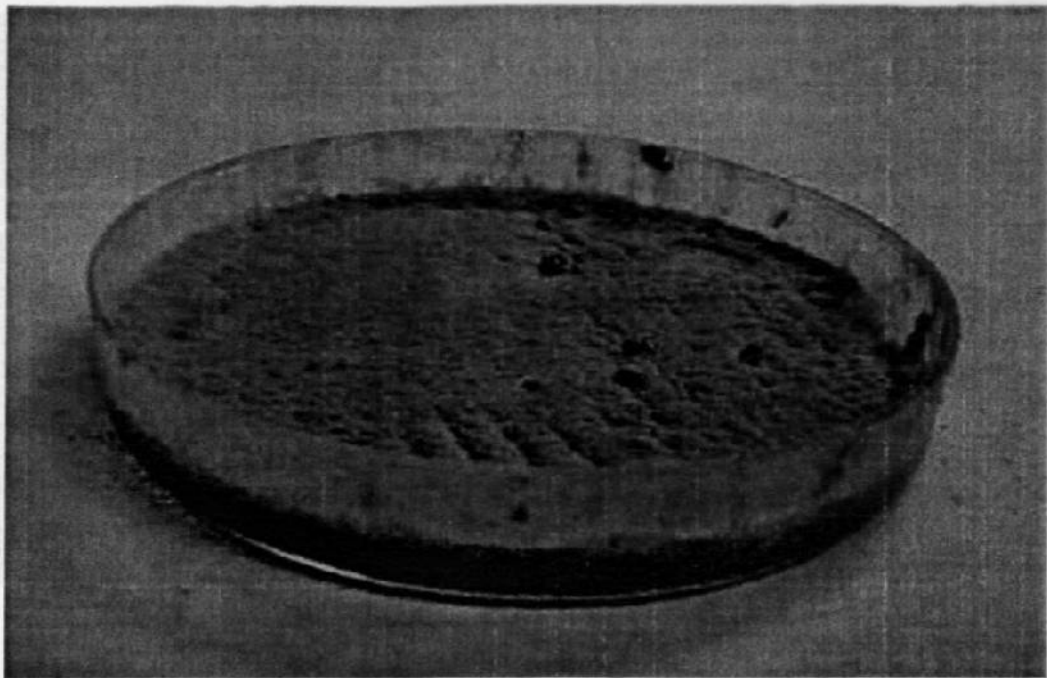
DS: Desviación estándar. n=3. Valor seguido por una letra igual no son diferentes significativamente.  
Tukey  $P < 0.05$ .

Apéndice No. 3.

**Apéndice No. 4.**

Producción de biomasa de *P. fumosoroseus* (Pfr-612)

Crecimiento de *P. fumosoroseus* (Pfr-612) en Agar Papa dextrosa.



Apéndice No. 5.

Producción de biomasa de *P. fumosoroseus* (Pfr-612)  
en un medio de cultivo líquido.

Apéndice No. 5.

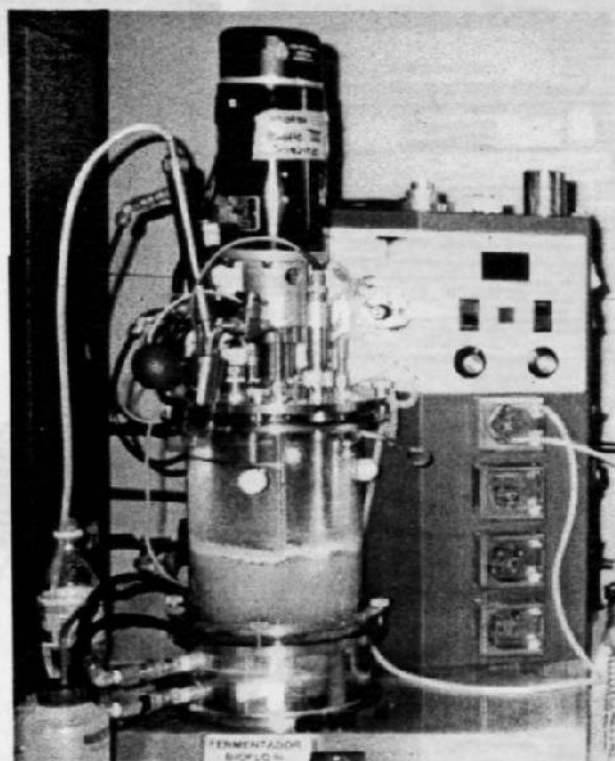
Producción de biomasa de *P. fumosoroseus* (Pfr-612)  
en diferentes medios de cultivo líquidos.



Apéndice No. 7.

Apéndice No. 6.

Producción de biomasa de *P. fumosoroseus* (Pfr-612)  
en un medio de cultivo a base de sacarosa y peptona de colágena.



### Apéndice No. 7.

Extractos de blastosporas de *P. fumosoroseus* (Pfr-612)  
Selladas en bolsas de plástico al vacío.





