



USO DEL LIRIO ACUATICO COMO
TEXTURIZANTE EN LA
PRODUCCION DE CONIDIOS DE
HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN
CULTIVO EN SOPORTE SOLIDO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 17:00 horas del día 18 del mes de marzo del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ERNESTO FAVELA TORRES
- DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
- DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO
- DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA
DE: RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO
ALUMNO

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

Aprobar

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

VOCAL

DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA
MONTERO

SECRETARIA

DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**“USO DEL LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE EN LA PRODUCCIÓN DE
CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN CULTIVO EN SOPORTE
SÓLIDO”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

ASESOR

Dra. ISABELLE PERRAUD GAIME

ASESOR

2016

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466.

Agradezco al CONACYT por la beca otorgada (237041).

DEDICATORIA

México D.F. a 18 de marzo del 2016.

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

**USO DEL LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE EN LA PRODUCCIÓN DE
CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN CULTIVO EN SOPORTE
SÓLIDO**

que presentó

M. en B. Rafael Alejandro Angel Cuapio

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

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

Asesor: Dra. Isabelle Perraud Gaime
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

JURADO

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Secretario: Dra. Isabelle Perraud Gaime
Instituto de Investigación para el Desarrollo - Francia

Vocal: Dr. Esteban Barranco Florido
Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco

Vocal: Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero
Universidad Autónoma Metropolitana – Cuajimalpa

DEDICATORIA

*A el amor de mi vida, a mi compañera que siempre me ha apoyado
como mi mano derecha.*

A Yolis

*A mi princesa, que llegó a mi vida y me enseña lo bello que es despertar
todos los días a pesar del cansancio y los problemas, a cambio de ver
su hermosa sonrisa*

A Alisson

*A mi familia, por esforzarse en comprender que si no estaba con ellos
era porque estaba persiguiendo mis sueños.*

A todos, gracias.

RESUMEN

Las plagas son la causa de enormes pérdidas económicas en cultivos de importancia agrícola y agropecuaria; como es sabido, la protección y cuidado de las cosechas se basa en gran parte en el uso de insecticidas químicos. La búsqueda de estrategias, técnicas y métodos que incrementan la productividad agrícola y mantengan el equilibrio ecológico sin agredir los ecosistemas ni arriesgar la salud humana, constituye un gran reto para la agricultura y el desarrollo sustentable. En este sentido, el estudio de los hongos entomopatógenos como *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* que son utilizados como agentes de control biológico de insectos plaga representa una valiosa alternativa en la protección del ambiente y en el equilibrio de la flora y la fauna.

Al respecto, los conidios son las unidades infectivas más importantes en los hongos entomopatógenos y la técnica más utilizada para su producción es el cultivo en soporte sólido. En esta investigación se evaluó la porosidad del lecho de empaque modificada por la incorporación de lirio acuático (agente texturizante) mezclado con arroz sobre la producción, calidad e infectividad de los conidios producidos por tres cepas de hongos entomopatógenos en cultivos sólidos. Se encontró que la producción de los conidios es inherente de la cepa utilizada, además, existe un intervalo de porosidad en el cual se incrementó el rendimiento. A su vez, la calidad de los conidios determinada por su viabilidad y germinación no se modificó. De la misma manera, la infectividad de los conidios evaluada a nivel laboratorio con insectos modelo, no se alteró. También, se realizó un estudio respirométrico (cuantificación de la producción de CO_2) con la finalidad de estimar indirectamente la tasa de respiración máxima (R_{max}) como la asociada a mantenimiento (R_e) y correlacionarlas con la producción de conidios.

Se comprobó que el lirio acuático puede ser utilizado como un texturizante en cultivos sólidos, ya que modifica la porosidad (ϵ) del lecho, sin ser utilizado como nutriente por los hongos entomopatógenos estudiados. Por eso, la porosidad es un parámetro que debe considerarse, ya que a partir de este es posible incrementar la producción de conidios, considerando que existen valores óptimos para ello, aparte la calidad e infectividad de los conidios no se vio afectada. Por otra parte, la porosidad es una variable que debe considerarse en la optimización de la producción de conidios ya que modifica tanto la tasa de respiración máxima, como la asociada a mantenimiento.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	Antecedentes	1
3	Revisión bibliográfica.....	3
3.1	Control biológico	3
3.2	Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos	4
3.2.1	Adhesión del conidio a la cutícula del hospedero y germinación del conidio	4
3.2.2	Penetración del conidio en el hemocele	5
3.2.3	Replicación en el hemocele	7
3.3	Producción de conidios	9
3.3.1	Tipos de sustrato	9
3.3.2	Tipos de producción	12
3.4	Agentes texturizantes y porosidad	14
3.5	Análisis respirométrico	16
3.6	Evaluación de la calidad de conidios	18
3.6.1	Viabilidad	18
3.6.2	Germinación	19
3.6.3	Hidrofobicidad	20
3.6.4	Bioensayos de infectividad	20
4	JUSTIFICACIÓN	22
5	HIPÓTESIS	24
6	OBJETIVOS	24
6.1	OBJETIVO GENERAL	24
6.2	OBJETIVOS PARTICULARES	24
7	MATERIALES Y MÉTODOS	25
	Estrategia experimental.....	25
7.1	Microorganismos, cultivo monoclonia, propagación y conservación.....	26
7.2	Condiciones de cultivo.....	28
7.3	Producción de conidios	29
7.4	Porosidad y densidad aparente.	31
7.5	Pruebas de viabilidad y germinación.....	32
7.6	Evaluación de la infectividad (Bioensayos)	34

7.7	Análisis de respirometría	36
7.8	Actividad respiratoria.	37
7.9	Análisis estadístico.	39
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
8.1	ETAPA UNO.....	40
8.1.1	Producción de conidios con y sin aireación en dos mezclas de AP:LA ..	40
8.1.2	Pruebas de calidad de los conidios obtenidos	43
8.1.3	Pruebas de infectividad.....	46
8.1.4	Análisis respirométrico	50
8.2	ETAPA DOS.....	52
8.2.1	Efecto de las proporciones AP:LA sobre la porosidad del lecho de empaque	52
8.2.2	Efecto de la porosidad sobre la producción de conidios.....	53
8.2.3	Efecto de la porosidad sobre los parámetros de infectividad.	60
8.2.4	Efecto de la porosidad sobre la viabilidad y germinación	62
8.2.5	Producción de conidios con lirio acuático de Xochimilco.....	64
8.3	ETAPA TRES.....	68
8.3.1	Correlación entre las tasas de respiración máxima y asociada a mantenimiento sobre la producción de conidios.....	68
9	CONCLUSIONES	72
10	PERSPECTIVAS	73
11	REFERENCIAS	74
12	ANEXO	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.2.1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos.	5
Figura 7.1.1 Reactivación, cultivo monoclonia y propagación de las cepas.	27
Figura 7.1.2. Conservación de las cepas.	28
Figura 7.2.1 Unidades experimentales.	29
Figura 7.3.1 Extracción y conteo para el conteo de conidios.	30
Figura 7.4.1 Determinación del espacio vacío.	31
Figura 7.5.1 Determinación de la germinación de los conidios.	33
Figura 7.5.2 Determinación de la viabilidad de los conidios.	33
Figura 7.6.1 Evaluación de la infectividad de los conidios.	35
Figura 7.6.2 Ajuste del modelo de decaimiento.	35
Figura 7.7.1 Instalación del respirómetro para la cuantificación de CO ₂	36
Figura 8.2.1. Fotografías de cultivos de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 (A) y ARSEF3302 (B) en el día 8, obtenidas en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).	56
Figura 8.2.2. Estados típicos de infección de larvas <i>Galleria mellonella</i> por <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1: a) larva no infectada; b) larva melanizada; c) larva con micosis.	62

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 8.1.2. Parámetros de calidad en conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX, producidos en 6 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), sin aireación.....	44
Gráfica 8.1.3. Parámetros de calidad en conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX, producidos en 6 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), con aireación.	45
Gráfica 8.1.4. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA); con y sin aireación (c/a y s/a).....	42
Gráfica 8.1.5. Parámetros de calidad en conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1, producidos en 7 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), sin aireación.	46
Gráfica 8.1.6. Parámetros de calidad en conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1, producidos en 7 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), con aireación.....	46
Gráfica 8.1.7. Producción de CO ₂ por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX e <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA) durante 9 días de cultivo.....	50
Gráfica 8.2.1. Porosidad (círculos) y densidad aparente (triángulos) en mezclas de arroz precocido-lirio acuático (AP:LA). La correlación lineal se indica como línea punteada.....	52
Gráfica 8.2.2. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF3302 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).	53
Gráfica 8.2.3. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).	54
Gráfica 8.2.4. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).	55
Gráfica 8.3.1 Producción de conidios (A), tasa de respiración (B), correlación entre ϵ y R (C), y correlación entre R y C (D), de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 sobre mezclas de AP-LA (% p/p).	70
Gráfica 8.3.2 Producción de conidios (A), tasa de respiración (B), correlación entre ϵ y R (C), y correlación entre R y C (D), de <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF sobre mezclas de AP-LA (% p/p).	71
Gráfica 8.4.1. Porosidad en mezclas de arroz precocido con lirio acuático obtenido de dos lotes diferentes. La correlación lineal se indica como línea punteada.....	64
Gráfica 8.4.2. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático de Xochimilco (LAX).....	65
Gráfica 8.4.3. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF3302 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático de Xochimilco (LAX).....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.2.1. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos.....	8
Tabla 3.3.1. Producción de conidios por hongos entomopatógenos en cultivo sobre	15
Tabla 8.1.1.1. Producción de conidios por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en 7 días.	41
Tabla 8.1.1.2. Producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en 7 días.....	43
Tabla 8.1.3.1. Parámetros de infectividad de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en larvas de <i>T. molitor</i> , utilizando conidios cosechados a los 7 días.....	47
Tabla 8.1.3.2. Parámetros de infectividad de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en larvas de <i>G. mellonella</i> , utilizando conidios cosechados a los 7 días.....	48
Tabla 8.1.3.3. Parámetros de infectividad de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en larvas de <i>G. mellonella</i> , utilizando un inóculo de 1×10^8 conidios mL^{-1}	49
Tabla 8.1.3.4. Parámetros de infectividad de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en larvas de <i>G. mellonella</i> , utilizando un inóculo de 5×10^7 conidios mL^{-1}	49
Tabla 8.1.4.1. Parámetros cinéticos obtenidos por respirometría para los hongos <i>M. anisopliae</i> CP-OAX e <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1.....	51
Tabla 8.2.2.1. Efecto de la porosidad en la producción de conidios de las cepas de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF3302.	57
Tabla 8.2.2.2. Extracción de conidios producidos en el día 8 por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1.	59
Tabla 8.2.2.3. Extracción de conidios producidos en el día 8 por <i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302.	59
Tabla 8.2.3.1. Parámetros de infectividad de los conidios obtenidos de cultivos con distinta porosidad, de las cepas de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 y ARSEF3302 sobre larvas de <i>G. mellonella</i> como insecto hospedero.....	61
Tabla 8.2.4.1 Pruebas de calidad de conidios de <i>Isaria fumosorosea</i> ARSEF3302 en CSS.	63
Tabla 8.2.4.2 Pruebas de calidad de conidios de <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 en CSS.	63
Tabla 8.2.4.3 Pruebas de calidad de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX en CSS.	63
Tabla 8.2.5.1. Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA.....	66
Tabla 8.2.5.2. Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA.....	67

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AMS	Agar Maltosa Sabouraud
AP	Arroz Precocido
X	Cantidad de producción de CO_2 en el tiempo
X_0	Cantidad de producción de CO_2 inicial
$X_{m\acute{a}x}$	Cantidad de producción de CO_2 máxima
m	Coefficiente de mantenimiento
$Y_{X/S}$	Coefficiente de producción de CO_2
C_r	Conidios por gramo de arroz seco inicial
CSS	Cultivo sobre Soporte Sólido
ρ_b	Densidad Aparente
HE	Hongo Entomopatógeno
LA	Lirio Acuático
m^*	Parámetro adimensional que relaciona el coeficiente de crecimiento, multiplicado por el coeficiente de mantenimiento y dividido entre la tasa específica de producción de CO_2
A	Parámetro adimensional que relaciona la producción de CO_2 máxima y la producción de CO_2 inicial
W_s	Peso de la muestra
S_f	Porcentaje de sobrevivencia estimada asintótica
ε	Porosidad o fracción vacía
R_A	Tasa de producción de CO_2 máxima
R_e	Tasa de respiración asociada al mantenimiento
$R_{m\acute{a}x}$	Tasa de respiración máxima
k	Tasa específica de muerte
μ	Tasa específica de producción de CO_2
$\mu_{m\acute{a}x}$	Tasa específica máxima de producción de CO_2
TEMA	Tecnología Especializada en el Medio Ambiente
t	Tiempo
t_0	Tiempo en que aparece la primer larva muerta
TL_{50}	Tiempo en que se alcanza el 50% de mortalidad
F_{lag}	Tiempo lag
UFC	Unidades formadoras de colonias
V_m	Volumen de la muestra
V_t	Volumen total (incluye V_m y espacio vacío)

1 INTRODUCCIÓN

El empleo de plaguicidas químicos no siempre es la mejor estrategia para combatir una plaga específica debido a que frecuentemente está asociado a efectos negativos en el medio ambiente. El control biológico es un método que emplea organismos vivos como los hongos entomopatógenos, para reducir la densidad de la población de insectos considerados plaga (**De Faria y Wraight, 2007**). Los hongos entomopatógenos son microorganismos capaces de infectar y provocar enfermedades en insectos causándoles finalmente la muerte, dentro de los más utilizados para el control biológico encontramos a *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* que tienen un amplio rango de hospederos que pueden infectar (**Glare, 2004**). Para que sean utilizados como agentes de control es importante producir una unidad infectiva como los conidios aéreos, los cuales preferentemente son producidos por cultivo en soporte sólido (CSS) (**Ye et al., 2006**). Se ha demostrado que uno de los factores que puede limitar el crecimiento de los hongos en CSS es el empaquetamiento del sustrato, se han utilizado materiales denominados texturizantes que incrementan la porosidad del medio, evitan la compactación del sustrato, se incrementa el área de contacto sustrato-microorganismo y se favorece el intercambio gaseoso (**Dorta y Arcas, 1998; Nuñez-Gaona et al., 2010; Kang et al., 2005**).

El consumo de oxígeno (O_2) y la liberación de dióxido de carbono (CO_2) son resultados de la respiración, proceso metabólico mediante el cual los microorganismos aerobios obtienen energía para su crecimiento (**Raimbault, 1998**). La cuantificación del CO_2 y O_2 pueden ser usadas como estimar de forma indirecta el crecimiento de los microorganismos (**Cruz-Córdova et al., 1999; Saucedo-Castañeda et al., 1994**). Para ello se utilizan equipos denominados respirómetros que facilitan la cuantificación y monitoreo de los gases en la salida de los reactores,

de tal manera que proporciona información sobre el estado fisiológico del hongo en cultivo sobre soporte sólido (**Saucedo-Castañeda et al., 1994**).

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es considerada una maleza debido al impacto ambiental negativo que ocasiona su presencia en diferentes cuerpos de agua (**Villamagna y Purphy, 2010**). Por otro lado, el lirio acuático tiene aplicaciones como fertilizante, forraje, en la elaboración de artesanías, en la producción de biogás, para la atención de derrames petroleros y en el reciclaje de sustancias orgánicas o industriales. Del lirio acuático se puede obtener una fibra que podría utilizarse en CSS y que actualmente no hay reportes de su uso como texturizante para la producción de conidios de hongos entomopatógenos.

Además de realizar estudios sobre producción de conidios aéreos es importante determinar su calidad (viabilidad y germinación); la viabilidad es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar y formar una colonia nueva, expresada en porcentaje (**Borman et al., 2006**), por otro lado, la germinación es la emergencia del tubo germinativo a partir de un conidio. Se considera un conidio germinado, cuando el tamaño del tubo germinativo es mayor al ancho del conidio (**Ibrahim et al., 2002**).

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes proporciones de arroz y lirio acuático sobre la producción y calidad de los conidios obtenidos, de dos cepas de *Isaria fumosorosea* y una cepa de *Metarhizium anisopliae* en cultivo sobre soporte sólido

2 Antecedentes

En trabajos de investigación, se ha reportado el uso de materiales para la producción de conidios de HE, estos materiales denominados “texturizantes” modifican la porosidad del lecho, de modo que se favorece el intercambio gaseoso; **Kang et al. (2005)** reportaron la producción de conidios por *Beauveria bassiana* en un reactor de lecho empacado, usando como medio de cultivo una mezcla de arroz-salvado de trigo (7:3) que fue mezclada con 10% de espuma de polipropileno (soporte inerte) usado como texturizante, con 67% de humedad inicial y aireación forzada. Entre los resultados que se obtuvieron destaca que al incrementar la altura del lecho los rendimientos de conidios disminuyen, aunque los problemas pueden ser reducidos con aireación forzada y por la adición de la espuma de polipropileno (texturizante).

Por su parte, **Arzumanov et al., (2005)** realizaron varios experimentos para encontrar las condiciones óptimas de aireación y humedad para la conidiación de *Metarhizium anisopliae* en cultivo sobre soporte sólido. El cultivo fue realizado en birreactores de columna utilizando arroz (sustrato) y bagazo de caña (texturizante) en una proporción 50 % (peso/peso). Las conclusiones de los resultados obtenidos fueron: 1) la aireación forzada no es crucial para la conidiación de *M. anisopliae* (la conidiación no incrementa al incrementar la aireación), 2) los cambios en el contenido de humedad afectan la conidiación, el óptimo fue del 57-58 %, 3) no se encontró relación entre los factores estudiados.

Por otro lado, para estudiar el efecto de la humedad y el tamaño de inóculo en la esporulación de *Beauveria bassiana*, **Núñez-Gaona et al. (2010)** usaron salvado de trigo (fuente de carbono) y bagazo de caña (texturizante) en diferentes proporciones (% peso/peso): 100/0, 70/30, 50/50, 30/70. Se evaluaron diferentes contenidos de humedad (66, 75 y 80%) y se estudiaron varios niveles de inóculo (1×10^6 , 6×10^6 y 5×10^7 conidios/gss), con una temperatura de incubación de 28°C.

Se alcanzó un rendimiento máximo de 1.18×10^{10} conidios/gss en el CSS usando salvado de trigo con 66% de humedad y actividad de agua de 1 ($a_w = 1$); este rendimiento disminuye en un orden de magnitud al incrementar el contenido de humedad o con la adición de bagazo de caña. Por otro lado, en CSS usando salvado de trigo (66% humedad), se determinó el tiempo para obtener un rendimiento de 1×10^{10} conidios/gss, que se conoce como t_{10} , que puede predecirse usando un modelo considerando el tamaño de inóculo y rendimientos máximos. De esta manera, el t_{10} fue de 285 h con un inóculo de 1×10^6 conidios/gss, sin embargo, el t_{10} disminuye a 232 h y 148 h para un inóculo de 7×10^6 y 5×10^7 conidios/gss, respectivamente.

En un trabajo previo se utilizó arroz (sustrato) y lirio acuático (texturizante) para la producción de conidios de *B. bassiana* en CSS, empleados en diferentes proporciones porcentuales (%), obteniendo rendimientos 100% mayores (2.25×10^9 conidios/gssi) usando una mezcla arroz-lirio (90%-10%) con respecto al obtenido con arroz como único sustrato (1.04×10^9 conidios/gssi). Cuando se usa una mezcla de arroz-lirio (50%-50%) el rendimiento de conidios es significativamente distinto, al que se obtiene solo con arroz (9.83×10^8 conidios/gssi) (**Montesinos-Matías et al., 2009, resultados no publicados**).

3 Revisión bibliográfica

En este trabajo se presenta una breve revisión bibliográfica sobre el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de plagas agrícolas. Los aspectos revisados incluyen los mecanismos de acción (ciclo infectivo) de los hongos entomopatógenos, métodos de producción, así como la importancia de evaluar la calidad de los conidios obtenidos.

3.1 Control biológico

El control biológico es una actividad agrícola en tendencia creciente que busca la destrucción parcial de patógenos e insectos considerados plaga, frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales (**Spardo y Gullino, 2004**). Existen innumerables artículos y reportes sobre la utilización de microorganismos entomopatógenos, que por su capacidad de producir enfermedad y muerte en insectos, son utilizados como agentes de control biológico (**Tanada y Kaya, 1993; Glare, 2004; Jackson et al., 2010**). De los diferentes microorganismos empleados, los hongos entomopatógenos tienen mecanismos de invasión únicos que les permiten atravesar de forma directa la cutícula o la pared del tracto digestivo de los insectos, lo que los hace excelentes agentes de control biológico actuando como insecticidas de contacto (**Charnley y Collins, 2007**). Los insectos, por su parte, tienen mecanismos de defensa contra las agresiones de los entomopatógenos, que involucran barreras físicas, defensas humorales, defensas celulares y de comportamiento social (**Marmaras et al., 1996**).

La mayor parte de los insectos que atacan a las plantas cultivadas tienen enemigos naturales que los parasitan y matan, produciendo así una reducción considerable en su población. El uso de hongos entomopatógenos para la disminución de tales insectos constituye, por lo tanto, una estrategia importante de control, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan

para este propósito (**Vega et al., 2012**). Hongos como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium (Verticillium) lecanii* y *Paecilomyces (Isaria) sp.*, son comunes en el campo, y de ellos existen productos comercialmente disponibles (**De Faria y Wraight, 2007**). Estos hongos tienen un amplio rango de hospederos y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares (**Glare 2004**). La mayoría de las especies de hongos entomopatógenos son producidas en medios sólidos, donde el hongo crece como micelio superficial y produce conidios en hifas aéreas (**Deshpande 1999**). Existen reportes sobre la optimización de medios de cultivo y técnicas de producción que permitan obtener productos con alta efectividad (**Moura-Mascarin et al., 2010; Gao y Liu, 2010**).

3.2 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

Hasta el momento se han descrito más de 750 especies de hongos entomopatógenos y el aislamiento de nuevas cepas. Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (**De Faria y Wraight, 2007**). El desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (a) adhesión y germinación de los conidios en la cutícula del insecto, (b) penetración del conidio en el hemocele y (c) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (Figura 3.2.1).

3.2.1 Adhesión del conidio a la cutícula del hospedero y germinación del conidio

El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando el conidio del primero se adhiere en la superficie de este último. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción del conidio a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto, la adhesión o consolidación de la interfase entre el conidio pregerminado y la epicutícula; y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la

formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Tanada y Kaya, 1993; Pedrini *et al.*, 2007).

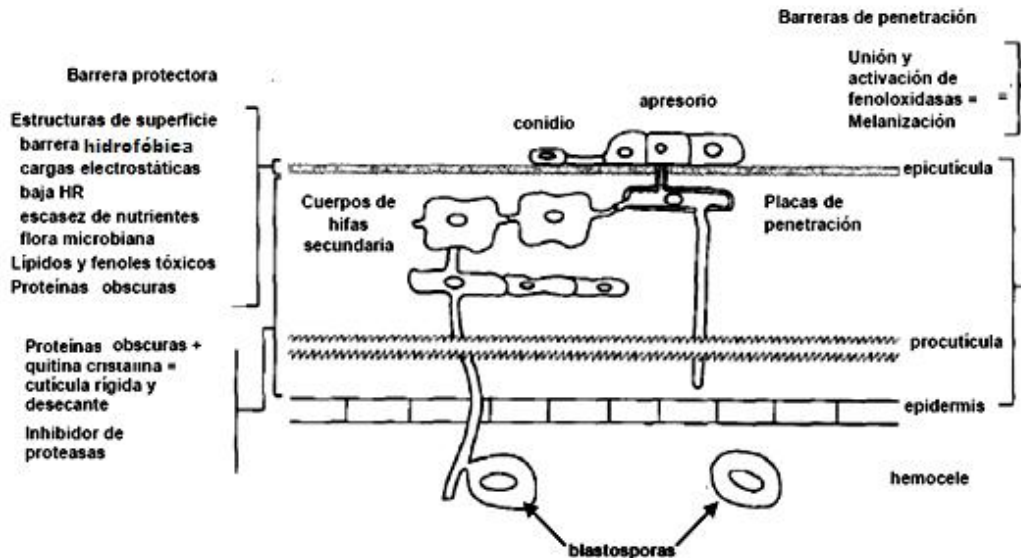


Figura 1: **Figura 3.2.1.** Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (modificado de Hajek y St Leger, 1994).

El proceso de adhesión del conidio a la cutícula del insecto está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas. En el entomopatógeno *Metharizium anisopliae* se ha descrito un tipo de adhesina denominada MAD1 la cual se localiza en la superficie de los conidios (Wang y St Leger, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que los iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas promoviendo la adhesión de los conidios (Pucheta-Díaz *et al.*, 2006).

3.2.2 Penetración del conidio en el hemocele

La forma en la que los hongos entomopatógenos penetran en el insecto depende de las propiedades de la cutícula tales como el grosor, la esclerotización

(endurecimiento y oscurecimiento de la quitina en el exoesqueleto), y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (**Charnley, 1992**).

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (**Monzón, 2001**). Hay estudios *in vitro* que indican que la digestión del integumento sigue una secuencia de lipasa-proteasa-quitinasa (**Tanada y Kaya, 1993**). Se ha observado que la acción enzimática puede ser coadyuvada por la secreción de ácidos orgánicos, como el ácido oxálico (**Bidochka y Khachatourians, 1991**).

La proteasa Pr1 es considerada un importante factor de virulencia en *Metarhizium anisopliae*, la sobreexpresión de esta enzima en el mismo hongo reduce en un 25% el tiempo letal 50 en *Manduca sexta*, en comparación con aquellos que fueron infectados con el genotipo silvestre (**St. Leger et al., 1996**). De la misma forma la sobreexpresión del gen que codifica para la quitinasa de *Beauveria bassiana* acelera el proceso de muerte en los insectos en un 23% (**Fan et al., 2007**). De esta manera, se demuestra la importancia de la secreción de estas enzimas hidrolíticas en la virulencia de los hongos entomopatógenos, lo cual pudiera ser una herramienta para la selección de mejores cepas para la formulación de insecticidas biológicos.

Otro mecanismo que utilizan los hongos para penetrar al hemocele es a través de la cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas del insecto. Puesto que la humedad no es un problema en el tracto alimenticio, el conidio puede

germinar rápidamente en este ambiente; aunque los fluidos digestivos pueden destruir o degradar la hifa germinativa. En algunos casos, la digestión de estructuras fúngicas puede causar la muerte por toxicidad más que por micosis (**Charnley, 1992**).

3.2.3 Replicación en el hemocele

La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis (una condición patológica causada por la acción de un veneno o toxina), deshidratación de las células por pérdida de fluido y consumo de nutrientes (**Bustillo, 2001**).

Ya en el interior del insecto, los hongos se enfrentan con los mecanismos de respuesta del sistema inmune para lo cual han desarrollado estrategias defensivas e inmunosupresoras, como la producción de toxinas o cambios estructurales en su pared celular. Existe un considerable número de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos (Tabla 3.2.1).

También, se ha observado que para evitar el ataque del sistema inmune del insecto, los hongos suelen prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como protoplastos, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele (**Vinson, 1991**). Cuando los nutrientes provenientes del insecto, particularmente la fuente de nitrógeno se va agotando, las fases levaduriformes retoman su crecimiento micelial, tal como fue observado en *Entomophthora thripidum* (**Freimoser et al., 2003**). Por último, cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, las hifas del hongo emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde realiza la conidiación (**Tanada y Kaya, 1993**).

Finalmente, la dispersión del conidio puede ser un proceso activo (por impacto al colisionar contra una superficie que interfiere en la trayectoria del flujo de aire) o pasivo (por sedimentación gravimétrica) y depende de las características del conidio y el esporangio. Cada conidio puede adherirse o pasar de un invertebrado a otro por dispersión (**Tanada y Kaya, 1993**).

Tabla 1: **Tabla 3.2.1.** Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos

Clasificación	Hongos que las producen
No peptídicas	
Oospereína	<i>Beauveria tenella, B. bassiana</i>
Tenellina	<i>B. tenella</i>
Bassianina	<i>B. bassiana</i>
Ácido oxálico	<i>Beauveria, Verticillium, Metarhizium</i>
Ácido fusárico	<i>Fusarium</i>
Ácido dipicolínico	<i>Beauveria, Paecilomyces, Verticillium</i>
Paecilomicinas	<i>Paecilomyces tenuipes</i>
Peptídicas lineales	
Leucinostinas	<i>Paecilomyces</i>
Efraeptinas	<i>Tolyptocladium</i>
Peptídicas cíclicas	
Beuvericina	<i>B. bassiana, Paecilomyces</i>
Beauverólidos	<i>B. bassiana, Paecilomyces</i>
Destruxinas	<i>Metarhizium</i>
Eniatinas	<i>Fusarium</i>
Ciclosporinas	<i>Metarhizium</i>

Modificado de Khachatourians (1996).

3.3. Producción de conidios

3.3.1 Tipos de sustrato

Las unidades infectivas más efectivas son los conidios; por consiguiente, se han reportado diferentes trabajos de investigación que conllevan a la mejoría en el rendimiento y esporulación de hongos entomopatógenos. Existen dos requerimientos nutricionales principales en el desarrollo de la esporulación, que son la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno. La glucosa es la fuente de carbono más utilizada por los hongos (**Pérez y Ramírez, 2000**), la fructosa y la manosa son las siguientes azúcares más utilizadas seguidas de la galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa y polisacáridos como el almidón, celulosa, lignocelulosa, pectina (**Griffin, 1981**) y quitina (**Hegedus et al., 1990**). Por su parte, el nitrógeno es requerido por los hongos para sintetizar aminoácidos, proteínas, y ácidos nucleicos necesarios para la construcción del protoplasma. Los hongos en su gran mayoría prefieren fuentes de nitrógeno orgánico como urea e hidrolizado de caseína, peptona, levadura y aminoácidos (**Hegedus et al., 1990; Jackson y Payne, 2007**). Sin embargo, también se han empleado fuentes inorgánicas de nitrógeno como KNO_3 , NaNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (**Bidochka y Khachatourians, 1991; Gao y Liu, 2010**).

Todos los medios de cultivo utilizados en la propagación de hongos deben contener los nutrientes suficientes (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc) para asegurar la biosíntesis de las moléculas requeridas en las células. El pH debe ser preferentemente ácido para facilitar el crecimiento de los hongos e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos (**Gao y Liu, 2010**), incluso se utilizan algunos antibióticos para inhibir el crecimiento de las bacterias que suelen contaminar las muestras.

El sustrato nutritivo comúnmente empleado para la producción de conidios de hongos es el arroz debido a su balance nutricional, bajo costos, amplia disponibilidad a nivel mundial, características físicas como el tamaño del grano,

buenas propiedades de hidratación e integridad estructural después de ser colonizado por el hongo (**Jenkins et al., 1998; Krishna, 2005**). Sin embargo, se han probado otros cereales para la propagación masiva de hongos entomopatógenos como: trigo, maíz, frijol y soya; así como, materiales procesados o subproductos como el bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, salvado de arroz, desechos de banano, café, harina de trigo, cascara de arroz, maíz molido; también se han empleado soportes inertes que son impregnados con medio de cultivo definidos, como la perlita, espuma de poliuretano y vermiculita, por mencionar algunos (**Dorta y Arcas, 1998; Monzón, 2001; Dalla Santa et al., 2004; Ye et al., 2006; Moura-Mascarin et al., 2010; Nuñez-Gaona et al., 2010; Van Breukelen et al., 2011**). Una de las ventajas ofrecidas por el uso sustratos inertes es la oportunidad de agregar los nutrientes para la conidiación óptima del aislado, además de analizar medios de cultivo con composición definida. Algunas consideraciones para la selección de sustratos como medios de propagación *in vitro* de hongos entomopatógenos son bajo costo, fácil adquisición y con alta eficiencia en cuanto al desarrollo y producción de altas concentraciones de conidios (**Krishna, 2005**).

Un amplio rango de sustratos sólidos está disponible para su uso en la producción de hongos entomopatógenos para el control biológico. El sustrato requerirá una preparación o pretratamiento tal como: cortar o moler para reducir el tamaño de partícula, para hacer más accesible el interior de las partículas; hidrólisis química para incrementar la susceptibilidad de las macromoléculas para la degradación por las enzimas microbianas durante la fermentación; así como la esterilización para eliminar o reducir contaminantes presentes en el sustrato (**Pandey, 2003**). Un sustrato ideal es aquel que proporciona espacios para la aireación, que mantiene sus partículas individuales separadas después de la hidratación y la esterilización, para proveer espacios entre partículas y la formación de conidios. Las partículas de los sustratos que son agrupadas cuando se agrega

el agua, reducen el área superficial y limitan el espacio donde la esporulación puede ocurrir.

El inóculo con conidios es comúnmente utilizado debido a que es fácil de preparar y razonablemente estable. El inóculo es mezclado con el sustrato para iniciar la fermentación, ya que el birreactor puede dificultar el mezclado y la aireación (**Arzumanov et al., 2005; Van Breukelen et al., 2011**). Uno de los principales desafíos en la operación del birreactor, es evitar indeseables aumentos de la temperatura dentro del lecho del sustrato fermentado, debido a la producción del calor metabólico del microorganismo (**Figuroa-Montero et al., 2011**). Para disminuir los inconvenientes de transferencia de gases se han utilizado materiales que modifican la porosidad del lecho de empaque durante el cultivo en soporte sólido, dichos materiales reducen la compactación del sustrato, se aumenta el área de contacto entre el sustrato y el microorganismo y se favorece así el intercambio gaseoso. Algunos materiales utilizados como texturizantes incluyen paja, desperdicios de algodón, aserrín, virutas de madera, residuos de poda (ramas y troncos secos), hierba seca, bagazo de caña de azúcar y espuma de poliestireno, entre otros (**Nuñez-Gaona et al., 2010; Kang et al., 2005, Dorta y Arcas, 1998; Arzumanov et al., 2005**).

La producción de hongos entomopatógenos se basa en la multiplicación masiva de sus estructuras reproductivas en un sustrato. Hasta la fecha se han evaluado diferentes soportes inertes impregnados con medio de cultivo y sustratos naturales, en otros casos, los sustratos utilizados son de bajo costo o de desechos agroindustriales y esto es apropiado para países en desarrollo con baja tecnología y mano de obra barata (**Monzón, 2001**). Entre los reportes de hongos entomopatógenos en cultivo sólido, destaca el trabajo de **Arzumanov et al., (2005)** en el cual encontraron una producción de conidios del orden de 5×10^9 conidios por gramo de materia seca, de una cepa de *Metarhizium anisopliae* sobre granos de arroz. Por otro lado, **Kim et al., (2010)** proponen la producción de conidios de *Isaria*

fumosorosea SFP-198 en bolsas de polietileno y usando un medio de cultivo basado en una mezcla de maíz-aceite de maíz para la obtención de 1×10^9 conidios por gramo de sustrato. A nivel planta piloto **Ye et al., (2006)** desarrollaron una cámara de fermentación de medio sólido para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* sobre arroz, alcanzando una producción de 2×10^9 conidios por gramo de arroz. Empleando soportes inertes, **Shi et al., (2009)** evaluaron diferentes soportes embebidos con medio de cultivo líquido, alcanzaron una producción de 1×10^{10} conidios por gramo de soporte inerte con la cepa *Verticillium lecanii* CBS 102071. En la **tabla 3.3.1** se citan algunos reportes realizados en cultivo en soporte sólido para la producción de conidios de hongos entomopatógenos. Se ha demostrado que la producción de estos propágulos fúngicos para la formulación de micoinsecticidas, es mayor en cultivo en soporte sólido que las obtenidas por cultivo en medio líquido (**Dorta y Arcas, 1998**).

3.3.2 Tipos de producción

Actualmente hay tres sistemas usados para la producción de hongos entomopatógenos: cultivo sólido, líquido y bifásico (en este método se utiliza el cultivo líquido para producir abundante micelio que luego se transfiere a un sustrato sólido para inducir la producción de conidios aéreos). Muchos trabajos están basados en fermentaciones sobre sustratos sólidos utilizando granos de cereales (**Jakson et al., 2010**); esta técnica es fácil de llevar a cabo, la materia prima es barata y los conidios producidos tienden a ser más tolerantes a la desecación comparado con los propágulos producidos en medio líquido (**Deshpande, 1999**). Los hongos entomopatógenos producen propágulos de acuerdo al método de cultivo empleado; en cultivo líquido se producen blastosporas y conidios sumergidos, mientras que en cultivo superficial y cultivo en medio sólido se producen sólo conidios (**Hegedus et al., 1990**). Los conidios tienen mejores características que las blastosporas para ser utilizadas en el control de plagas de insectos. A pesar de que las blastosporas germinan en menos tiempo; los conidios

son más resistentes durante el almacenamiento y frente a condiciones ambientales adversas. Por otro lado, la hidrofobicidad es superior en los conidios, esta característica contribuye a protegerlas contra la deshidratación y aumenta su capacidad de adhesión a la cutícula de los insectos (**Hegedus et al., 1992**). La resistencia de los conidios frente a condiciones ambientales adversas representa una gran ventaja sobre los plaguicidas convencionales debido a que produce efectos prolongados sobre las plagas de insectos (**Goettel y Roberts, 1992**).

El cultivo sólido ha dado la oportunidad a la industria de producir micoinsecticidas con un alto grado de automatización, con principios similares a aquellos de la fermentación líquida, lo que reduce costos de mano de obra y permite un control eficiente del proceso de producción donde se logra biomasa de alto valor infectivo y más resistente a condiciones ambientales adversas (**Jenkins et al., 1998; Jaronski y Jackson, 2012**). En estos sistemas también se logra un óptimo aprovechamiento de los nutrientes pero la inversión de capital inicial es muy alta. Para los países del tercer mundo esta tecnología presenta menos posibilidades de aplicación debido a las dificultades económicas y el alto costo de capital de estos procesos automatizados. La presencia de mano de obra barata y un mercado que es regional y pequeño hace viables económicamente a los sistemas de producción artesanales (baja tecnología), a pesar de requerir muchas operaciones manuales (**Deshpande, 1999; Jaronski y Jackson, 2012**).

Se han desarrollado otras tecnologías como el cultivo en medio líquido con un grado elevado de automatización del proceso. Estos suelen ser procesos muy rápidos en los cuales los hongos tienden a crecer como pellets miceliales y/o forman abundantes blastosporas (**Cliquiet y Jackson, 1999**), las cuales se forman por gemación a partir de fragmentos de micelio. Uno de los aspectos a considerar para el incremento de la utilización de los agentes microbianos de control biológico, es el mejoramiento de los procesos de producción a gran escala, lo que debe incluir la optimización de los métodos de cultivo (**Lacey et al., 2001**). La optimización de un

medio líquido, que garantice el rápido crecimiento de un determinado aislamiento, es uno de los pasos en el desarrollo de un procedimiento de producción masiva. Estos medios deben contener fuentes de carbono y de nitrógeno, así como microelementos y factores de crecimiento en condiciones óptimas (**Jenkins et al., 1998; Fargues et al., 2002**).

Por otro lado, en el cultivo bifásico se desarrolla el inóculo en cultivo líquido agitado (de forma rápida) o líquido estático (más lento) y luego se pasa al soporte sólido, donde el cultivo empieza con conidios ya germinados previamente, lo que disminuye la fase de arranque (fase lag) (**Moura-Mascarin et al., 2010**); en este sistema siempre se debe optimizar el cultivo de la fase líquida (proceso de germinación) para que promueva un rápido crecimiento del aislado.

3.4 Agentes texturizantes y porosidad

En el cultivo en soporte sólido, el crecimiento y metabolismo de los hongos se ven influenciados por diferentes factores como el pH, la temperatura, el contenido de humedad, el tamaño de partícula del sustrato, la transferencia de gases, entre otros (**Dorta y Arcas, 1998, Figueroa-Montero et al., 2011**). En cambio, para disminuir los inconvenientes de transferencia de gases cuyo factor está asociado con el empaquetamiento del sustrato dentro del reactor; se han utilizado materiales denominados texturizantes que modifican la porosidad del medio, evitan la compactación del sustrato, se incrementa el área de contacto sustrato-microorganismo y favorecen el intercambio gaseoso (**Dorta y Arcas, 1998; Nuñez-Gaona et al., 2010; Kang et al., 2005**). Dentro de los agentes texturizantes más utilizados se encuentran: paja, residuos de algodón, aserrín, viruta de madera, residuos de poda (ramas y troncos secos), pasto seco, bagazo de caña (**Nuñez-Gaona et al., 2010**) y espuma de polipropileno (**Kang et al., 2005**). El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es considerado una maleza debido al impacto ambiental negativo que ocasiona su presencia en diferentes cuerpos de agua, sin embargo, del mismo se puede obtener una fibra que podría utilizarse en CSS. Actualmente no

hay reportes de su uso como texturizante para la producción de conidios de hongos entomopatógenos.

Tabla 2: **Tabla 3.3.1.** Producción de conidios por hongos entomopatógenos en cultivo sobre

Hongo entomopatógeno	Unidad experimental	Producción conidios gmsi^{-1}	Tiempo días (d)	Sustrato	Variable de estudio	Referencia
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Columna	8.00E+09	12	Madera con medio	Tipo de sustrato y reactor	Van Breukelen <i>et al.</i> , (2010)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Columna	5.80E+09	7	Arroz	Efecto de la aireación	Arzumanov <i>et al.</i> , (2005)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Botellas	2.00E+10	14	Salvado de arroz-Cascara de arroz	Actividad de agua	Dorta <i>et al.</i> , (1990)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Columna	1.80E+12	14	Salvado de arroz-Cascara de arroz	Densidad aparente	Dorta y Arcas, (1998)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Bolsa polipropileno	1.10E+09	7	Arroz	Sustrato	Moura-Mascarin <i>et al.</i> , (2010)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Bolsa polietileno	2.10E+09	21	Maiz molido	Sustratos (granos de cereales)	Kim <i>et al.</i> , (2010)
<i>Isaria fumosorosea</i>	Matraz	1.14E+11	11	Arroz precocido	Producción de conidios, infectividad, actividad Pr1	Moura-Mascarin <i>et al.</i> , (2013)
<i>Isaria farinosa</i>	Bolsa polipropileno	1.30E+09	7	Semilla de soja	Sustrato	Moura-Mascarin <i>et al.</i> , (2010)
<i>Isaria javanica</i>	Bolsa de plastico	3.00E+10	15	Cebada de arroz	Aditivos en la producción e infectividad	Kim <i>et al.</i> , (2014)
<i>Verticillium lecanii</i>	Matraz	1.00E+10	11	Bagazo de caña con medio	Fuente de C y N	Shi <i>et al.</i> , (2009)
<i>Beauveria bassiana</i>	Botellas serologicas	1.10E+10	14	Salvado de trigo	Sustrato-Texturizante	Nuñez-Gaona <i>et al.</i> , (2010)
<i>Beauveria bassiana</i>	Charolas	2.40E+10	7	Arroz	Diseño de reactor	Ye <i>et al.</i> , (2006)
<i>Beauveria bassiana</i>	Columna	1.07E+10	10	Bagazo de caña-Residuos patata	Residuos agroindustriales, tipo de reactor	Dalla Santa <i>et al.</i> , (2004)
<i>Beauveria bassiana</i>	Botellas de vidrio	3.70E+10	10	Salvado de trigo-Cascara de arroz	Producción de conidios, viabilidad e infectividad	Arcas <i>et al.</i> , (1999)
<i>Beauveria bassiana</i>	Matraz	1.14E+11	11	Arroz precocido	Producción de conidios, infectividad, actividad Pr1	Moura-Mascarin <i>et al.</i> , (2013)
<i>Beauveria bassiana</i>	Bolsa de plastico	2.50E+09	8	Arroz	Vida de anaquel en condiciones de laboratorio	Taylor <i>et al.</i> , (2013)

Todo material se caracteriza, entre otros aspectos, por la distribución estructural de sus partículas, las cuales dejan espacios entre sí creando poros internos o externos, en mayor o menor medida según el tipo de material y su forma de fabricación y aplicación. La porosidad (ϵ) es una propiedad física, que se define como el volumen ocupado por los espacios vacíos (V_v) por unidad de volumen total (V_t) (**Mitchell et al., 2006**). Esta porosidad se determina normalmente mediante técnicas experimentales, basadas en introducir un fluido en los poros y cuantificar su volumen.

La densidad es una propiedad elemental y fundamental de los materiales, relacionada con la naturaleza de sus constituyentes y la existencia de espacios vacíos entre ellos. La densidad (ρ_b) se define como la masa (m) por unidad de volumen (V), y se expresa en kg/m^3 . Conocida la masa y el volumen de una muestra se determina de forma inmediata su densidad (**Mitchell et al., 2006**).

3.5 Análisis respirométrico

La respirometría es una técnica basada en la medición del consumo de oxígeno por parte de microorganismos que crecen a partir de un sustrato orgánico, el cual es degradado y oxidado a dióxido de carbono (CO_2). Esta técnica presenta crecientes aplicaciones en la determinación de la cinética de respiración y en algunos casos de crecimiento. El análisis respirométrico permite adquirir datos sobre el consumo de oxígeno (O_2) en respuesta al metabolismo de un sustrato por la respiración de microorganismos (**Saucedo-Castañeda et al., 1994**). La respirometría ahorra el tiempo y el trabajo asociados con los experimentos de agotamiento de sustratos y provee puntos de referencia de alta calidad para la valoración de parámetros cinéticos. La respirometría tiene un extenso campo de aplicación en biotecnología, siendo las más frecuentes (**Bellon-Maurel et al., 2003**):

1. Determinación de la tasa de consumo de oxígeno en efluentes domésticos e industriales.
2. Determinación de la combinación óptima de factores para el tratamiento por biodegradación en suelos contaminados con petróleo y/o sus derivados.
3. Determinación de la influencia tóxica y el poder inhibitorio de algunos vertimientos sobre las poblaciones microbiológicas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.
4. Determinación de la efectividad de cultivos microbiológicos y su comportamiento en la digestión de algún sustrato en particular.
5. Determinación de las características de biodegradación de productos químicos específicos o de mezclas químicas.
6. Determinación de los parámetros cinéticos para las reacciones de biodegradación.
7. Monitoreo de la aclimatación de un cultivo de microorganismos a materiales orgánicos refractarios.
8. Medición de la actividad metabólica de cultivos aeróbicos tanto como anaeróbicos.
9. Determinación de la tasa de consumo de oxígeno de plantas, pequeños animales, suelo o muestras de compost o residuos vegetales.

Un respirómetro es un instrumento que sirve para medir tasas de respiración aerobia de una población microbiana en determinadas condiciones. El respirómetro determina la cantidad de oxígeno consumido y/o dióxido de carbono producido (**Saucedo-Castañeda et al., 1994; Pintado et al., 1998; Zitova et al., 2010**) por unidad de tiempo y de volumen. Algunos autores consideran al respirómetro como un sensor, ya que consiste en una unidad física con una entrada de muestra externa y una salida de resultados, obtenida después de un procedimiento interno. Por otra parte, los resultados son extremadamente dependientes de las condiciones de trabajo y, por tanto, puede existir una variabilidad en la salida (**Bellon-Maurel et al., 2003; Pliego-Sandoval et al., 2012**). Esta variabilidad cuestiona el hecho de que

se considere sensor al respirómetro y obliga a que los resultados de las respirometrías se acompañen de las condiciones de operación como: el estado de la biomasa (concentración, pH, temperatura, etc), el tipo de sustrato utilizado y la temporalidad de la medida de oxígeno o dióxido de carbono (puntual o continua).

La función de un respirómetro continuo, consiste en circular o permitir circular el aire de manera ininterrumpida en el recipiente donde se lleva a cabo la determinación. Se mide el caudal y la concentración de oxígeno en el aire a la entrada y a la salida de forma permanente, para así poder determinar por diferencia el consumo instantáneo de oxígeno (**Raimbault, 1998; Prado et al., 2004**). A partir de la curva de consumo de oxígeno en función del tiempo se puede obtener la tasa instantánea de consumo de oxígeno (**Lareo et al., 2006; Figueroa-Montero et al., 2011; Sánchez Arias et al., 2012**).

3.6 Evaluación de la calidad de conidios

Los parámetros de calidad de hongos utilizados para el control de insectos plaga se realizan sobre el producto final, es decir, sobre el formulado que se aplicará en campo. El propósito del control de calidad es llevar a cabo pruebas que predigan el funcionamiento del enemigo natural en campo, además de detectar alguna irregularidad en los sistemas de producción de conidios. Por eso las pruebas como viabilidad, germinación, hidrofobicidad e infectividad, juegan un papel importante en la evaluación de la eficiencia del producto (**Jenkins et al., 1998**).

3.6.1 Viabilidad

La viabilidad es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de desarrollar unidades formadoras de colonias (UFC), expresada en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es de una viabilidad mayor del 80% (**Jenkins et al., 1998**). La viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye

con el tiempo, esto depende de las condiciones de almacenamiento; esta prueba debe realizarse al momento de la extracción y formulación del material, a diferentes intervalos de tiempo durante el periodo de almacenamiento y antes de ser usado. De hecho, hay diferentes factores nutricionales y factores ambientales como la temperatura, luz y pH que afectan la viabilidad, germinación, crecimiento vegetativo y esporulación (**Krishna, 2005**). Esta prueba también tiene como finalidad establecer la proporción del agente biológico e identificar los microorganismos contaminadores, contribuyendo a mejorar el proceso de producción y formulación de los entomopatógenos. Los lotes deberán estar libres de todo tipo de contaminaciones.

Las formulaciones basadas en hongos entomopatógenos (HE) tienen un tiempo de vida media entre 6 y 12 meses, una de las razones por el cual presentan un tiempo corto es su débil estabilidad a altas temperaturas (**Kim et al., 2010**). Sin embargo, es posible que la edad y condiciones de almacenamiento, puedan contribuir en la viabilidad y estabilidad morfológica en periodos largos (**Borman et al., 2006**).

3.6.2 Germinación

La germinación es la formación del tubo germinativo a partir de un conidio. Se realiza como un indicador de la capacidad y velocidad de los conidios del hongo, para emitir un tubo germinativo *in vivo* y, poder penetrar potencialmente la cutícula del insecto objetivo. Se considera un conidio germinado, cuando el tamaño del tubo germinativo es mayor al ancho del conidio (**Ibrahim et al., 2002**). Las condiciones nutricionales y la temperatura son factores que afectan la germinación. Una germinación rápida ayuda a tener una mayor probabilidad de éxito en el campo, ya que los aislados con una lenta germinación están en desventaja porque están expuestos a las condiciones desfavorables más tiempo lo cual reduce su viabilidad en el campo (**Fernández-Rosas, 2006**). Se debe notar que la germinación no

garantiza la viabilidad de los conidios, por lo que ambas pruebas son complementarias.

3.6.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de los conidios es un concepto general a nivel físico, es una propiedad de la superficie de los conidios que permite eventualmente asociarse a sustratos u hospederos (**Jeffer y Khachatourians, 1997**). De hecho, la hidrofobicidad de la superficie de los microorganismos es fundamental para su adhesión a las superficies con las que interactúan (**Le-Tian et al., 2010**). En el caso de los conidios, la hidrofobicidad es el resultado de una capa sobre la superficie de estructuras proteicas (hidrofobinas) en forma de varillas (rodlets) (**Kim et al., 2010**). La adhesión a la cutícula del hospedero es el primer contacto que se hace con la superficie del hospedero; las características físicas y químicas de las superficies de la cutícula del insecto y el conidio, son las responsables de esta unión. En algunos hongos, la adhesión es un fenómeno específico; mientras en otros, no lo es, determinado por componentes como la glicoproteínas que pueden servir como un receptor específico (**Brinkman y Gardner, 2000; Ying et al., 2004; Le-Tian et al., 2010**).

3.6.4 Bioensayos de infectividad

Se denomina bioensayos a las pruebas que se realizan con organismos vivos, con el objeto evaluar la capacidad del hongo entomopatógeno y determinar su infectividad a través de parámetros establecidos como el tiempo letal medio (TL_{50}) y la concentración letal media (CL_{50}). Estos parámetros que son identificados bajo condiciones controladas en laboratorios especializados, permiten identificar el potencial de un hongo entomopatógeno sobre el insecto que se desea controlar, como una primera aproximación en el desarrollo de una estrategia de control que involucre a los conidios como ingrediente principal de un micoinsecticida (**Vega et al., 2012; Eken et al., 2006**). Posteriormente, una vez identificadas las cepas con

potencial, estas deberán proseguir hacia una siguiente fase de bioprospección que involucre evaluaciones en campo, las cuales demandan periodos extensos de tiempo, ya que requiere las repeticiones en el tiempo y en diferentes ambientes para determinar de forma exhaustiva el potencial infectivo de los hongos entomopatógenos bajo estudio.

4 JUSTIFICACIÓN

El desconocimiento y mal uso de plaguicidas químicos afectan a todo el entorno, provocando un desequilibrio en el ecosistema. De esta manera, el control biológico es una herramienta sustentable, ecológica que bien operada evita esos desequilibrios reportados e involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga (**De Faria y Wraight, 2007**). El control biológico considera a los hongos entomopatógenos, los cuales tienen la capacidad de regular poblaciones de insectos considerados plaga en el sector agrícola. Hongos como *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae* tienen un amplio rango de hospederos que pueden infectar, los cuales perjudican cultivos de gran importancia económica en todo el mundo (**Glare, 2004**); además, son inofensivos contra organismos benéficos (**Zimmerman 2007; Zimmerman 2008**). Para producir estos hongos en gran escala se requiere una unidad infectiva como los conidios aéreos, los cuales suelen ser producidos en cultivo sobre soporte sólido (CSS) y da lugar a la producción de conidios más resistentes a los factores abióticos comparado con el micelio y las blastosporas producidas en cultivo líquido (**Jackson et al., 2010**).

Durante la degradación de la fuente de carbono, el sustrato sólido es transformado en biomasa, agua (H₂O) y dióxido de carbono (CO₂) (**Raimbault, 1998**). La cuantificación del consumo de oxígeno (O₂) y la producción de CO₂; que son resultados de la respiración, puede ser usada como una medición indirecta del crecimiento del microorganismo (**Cruz-Córdova et al., 1999; Saucedo-Castañeda et al., 1994**). Para lo cual, se han desarrollado procesos de monitoreo de los gases de salida como la respirometría, que pueden proporcionarnos una adecuada información sobre el estado fisiológico del hongo en CSS (**Saucedo-Castañeda et al., 1994**).

Por otro lado, en México el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una maleza generadora de los mayores problemas que afecta a diversos cuerpos de agua; su retiro y disposición final es una tarea que en muchas ocasiones se realiza con equipos y alternativas ineficaces como herbicidas y máquinas trituradoras que se usan para su retiro que en lugar de acabar con el lirio lo multiplica. Algunos de los efectos perjudiciales son: a) efectos sobre la biodiversidad y ecosistemas; ya que cubre extensas superficies en presas, lagunas y canales, impidiendo el libre paso del agua, además afecta la supervivencia de las plantas y los animales nativos, b) cultivos afectados y efectos sobre los cultivos; se afecta la acuicultura ya que el lirio agota el O₂ del embalse, c) impacto sobre la salud humana; ya que favorece el desarrollo de mosquitos que producen daños a la salud humana y del ganado, d) impacto económico y social; crea problemas a la pesca y al mantenimiento apropiado de áreas recreativas (**Malik, 2007; Villamagna y Murphy, 2010**).

Ante esta preocupación, se ha despertado el interés por aprovechar lo que se ha considerado como una planta indeseable y enfocarla como un residuo aprovechable en CSS para la producción de nuevos productos. Por esta razón, se propone utilizar lirio acuático como agente texturizante en CSS, para modificar la porosidad del lecho de empaque y en consecuencia la producción de conidios.

5 HIPÓTESIS

La adición de lirio acuático como texturizante en cultivos sólidos de hongos entomopatógenos sobre arroz aumentará la producción de conidios sin alterar su calidad.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

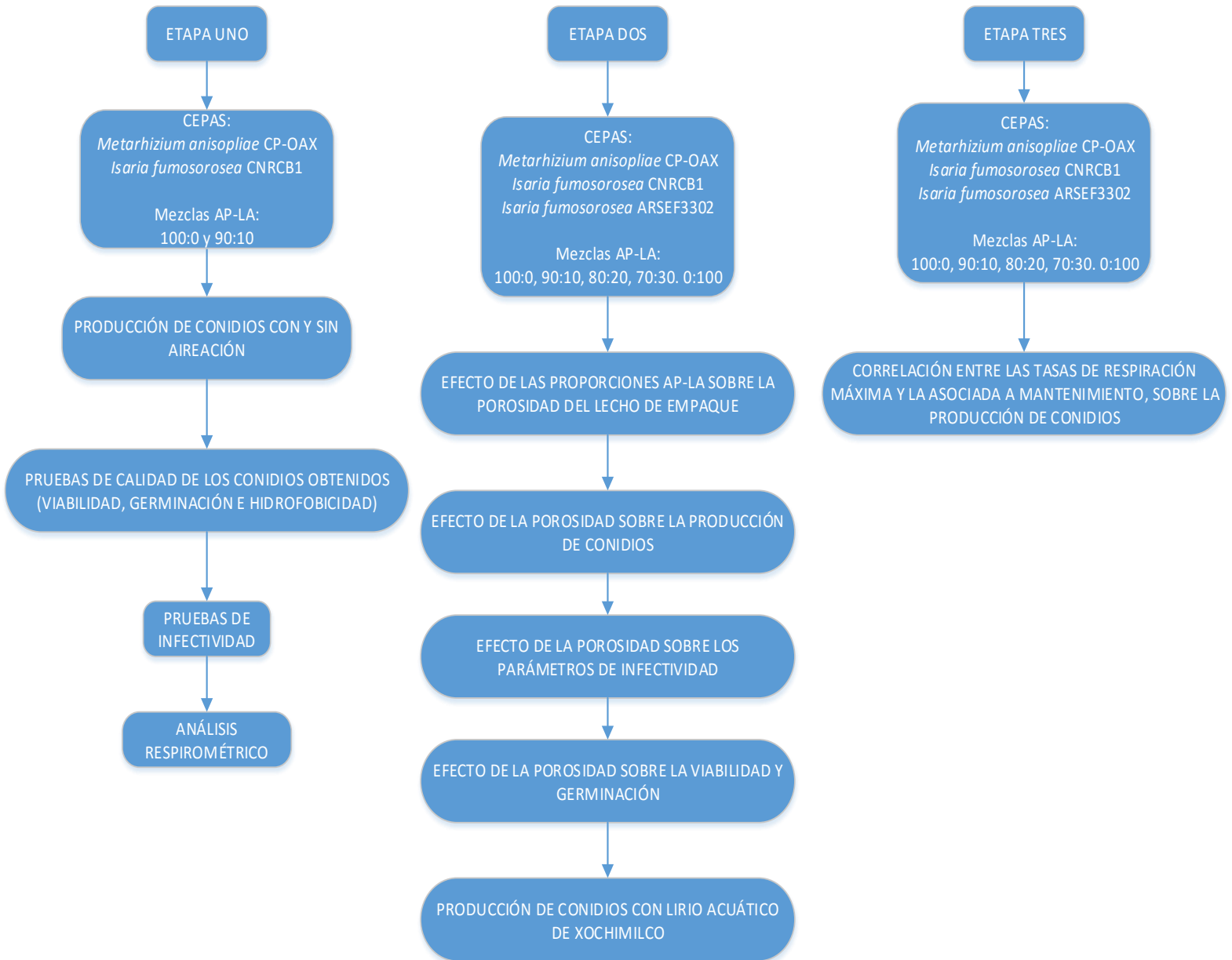
Evaluar el efecto de las proporciones de arroz y lirio acuático como texturizante sobre la producción y calidad de los conidios, de dos cepas de *Isaria fumosorosea* y una cepa de *Metarhizium anisopliae* en CSS.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Evaluar el efecto de las proporciones de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), sobre la porosidad del lecho de empaque.
- ✚ Determinar el efecto de la porosidad sobre la producción de conidios de hongos entomopatógenos (HE).
- ✚ Evaluar el efecto de la porosidad sobre la germinación y viabilidad de los conidios obtenidos por HE.
- ✚ Evaluar el efecto de la porosidad sobre la infectividad de los conidios obtenidos por HE.
- ✚ Correlacionar las tasas de producción de CO₂ máxima ($R_{máx}$) y la asociada al mantenimiento (R_e), sobre la producción de conidios de HE.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental



7.1 Microorganismos, cultivo monoclonia, propagación y conservación.

El estudio se realizó con tres cepas de hongos entomopatógenos. Dos cepas de *Isaria fumosorosea* y una de *Metarhizium anisopliae*. La cepa CNRCB1 proporcionada por el *Centro Nacional de Referencia de Control Biológico* (CNRCB) (Tecomán, Colima, México), con clave CHE-CNRCB 303; y la cepa ARSEF3302 obtenida del *Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures* (ARSEF) (Ithaca, New York, U.S.A.). Ambas cepas se identificaron como *Isaria fumosorosea* mediante la amplificación de la región ribosomal usando los primers ITS1 y ITS4 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), con los números de acceso en el GenBank HM209049 y HM209050, para *I. fumosorosea* CNRCB1 y *I. fumosorosea* ARSEF3302, respectivamente (**Miranda-Hernández et al., 2014**). La cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX perteneciente a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados (COLPOS) (Texcoco, Estado de México). Esta cepa fue identificada como *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* mediante la amplificación de la región ribosomal usando los primers ITS5 y ITS4b, con número de acceso en el GenBank FJ876298 (**Tlecuitl-Beristain et al., 2010**).

Se obtuvieron cultivos monoclonia para ambas cepas de la siguiente manera (Figura 7.1.1): se inocularon por estría en cajas Petri de 90 x 15 mm con agar maltosa Sabouraud (AMS) cuya composición es la siguiente (g L⁻¹): maltosa 20, peptona de carne 2.5, peptona de caseína 2.5, extracto de levadura 0.5 y agar 15 (todos los constituyentes; Bioxon, México), los cultivos se incubaron durante 10 días a 28 °C. Subsecuentemente, se realizó la reactivación de las cepas mediante la infección de insectos hospederos, se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor* para las cepas de *Isaria fumosorosea* y *Metarhizium anisopliae*, respectivamente. Posteriormente, del insecto micosado se tomó una asada de conidios y se sembró nuevamente por estría en cajas de Petri con medio agar dextrosa Sabouraud, ADS (Bioxon, México) adicionado con desoxicolato de sodio al 0.05% (Sigma-Aldrich, Auckalnd, New Zealand) que es un inhibidor de crecimiento de organismos formadores de conidios y facilitó la obtención de colonias aisladas (**Montesinos-Matías et al., 2011**). De este cultivo, colonias independientes

fueron propagadas por estría en cajas Petri y matraces Erlenmeyer con 20 mL y 50 mL de medio ADS, respectivamente. Los cultivos se incubaron durante 10 días a 28 °C.

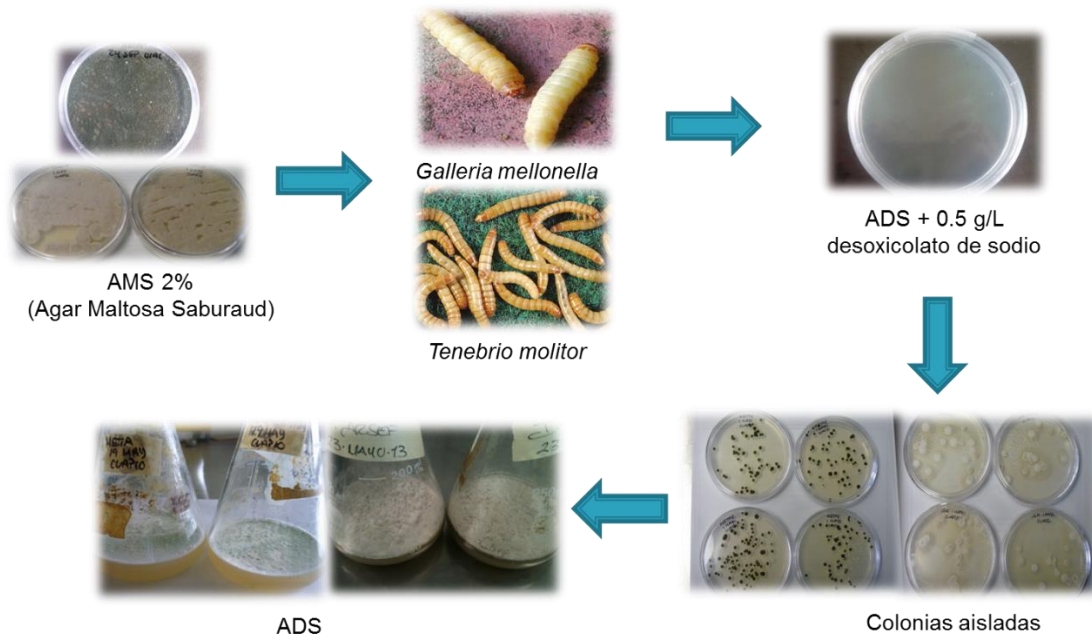


Figura 7.1.1 Reactivación, cultivo monoclonia y propagación de las cepas.

Se realizó la conservación de las tres cepas a largo plazo mediante el métodos de agua desionizada estéril (**López-Lastra et al., 2002**), para ello se utilizaron cultivos esporulados en cajas Petri, en condiciones asépticas se cortaron pequeños bloques de aproximadamente 25 mm² y se colocaron dentro de viales de vidrio, posteriormente los viales fueron conservados a 4 °C. Los viales de vidrio cuyas dimensiones son: 150 x 15 mm con tapa de rosca contenían 4 mL de agua desionizada estéril (Figura 7.1.2). La conservación fue realizada cada 6 meses usando este método, ya que después de este tiempo la viabilidad de las cepas disminuye gradualmente (**López-Lastra et al., 2002**). Para todos los experimentos posteriores de producción de conidios, fueron iniciados tomando un vial de conservación y se transfirió asépticamente los bloques de inóculo en cajas Petri con medio ADS. Se realizó la propagación en matraces Erlenmeyer 250 mL conteniendo 50 mL de medio ADS, previamente esterilizado en autoclave a 15 PSI durante 15

min. Las cajas y los matraces fueron incubados a 28 °C durante 10 días y entonces se usaron para llevar a cabo los experimentos.

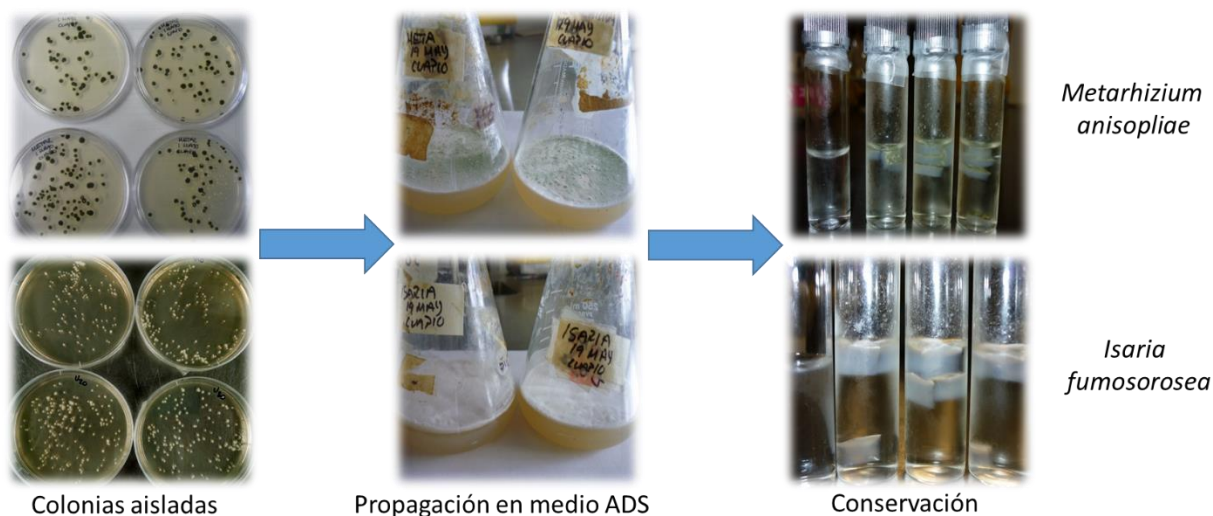


Figura 7.1.2. Conservación de las cepas.

7.2 Condiciones de cultivo

Se utilizaron frascos de vidrio sin tapa como unidades experimentales, con las siguientes características: volumen (v) de 80 mL, diámetro interno (\varnothing_i) de 5 cm y altura (L) de 4.7 cm, en los cuales se pesó la materia sólida (Figura 7.2.1). Se utilizó arroz precocido (AP) como sustrato, arroz precocido se refiere a un arroz tratado con vapor, el cual está comercialmente disponible en esta presentación por Verde Valle™ (Uruguay). Se utilizó lirio acuático (LA) como texturizante, obtenido por la empresa *Tecnología Especializada en el Medio Ambiente* (TEMA, México). Se adquirió un lote de fibra de lirio acuático sin raíz, es decir, solamente se utilizó hoja y tallo. El arroz y el lirio fueron pasados en tamices con un diámetro de poro de 3.36, 2.88, 2.37, 2, 1.19 y 0.80 mm (tamices del No. 6, 7, 8, 10, 16 y 20, respectivamente); para experimentos posteriores, se seleccionaron partículas con 2 mm de ancho para el lirio acuático y de 2 mm de ancho por 5 mm de largo para el arroz (tamiz No 10). Se probaron las siguientes mezclas de AP:LA expresadas en porcentaje, con un total de 10 g de materia sólida inicial (en peso seco) en cada frasco, las proporciones fueron AP:LA (% peso/peso): 100:0, 90:10, 80:20 y 70:30.

La cantidad de arroz fue diferente en cada tratamiento, arroz precocido (g); 10, 9, 8 y 7 para las mezclas AP:LA (%): 100:0, 90:10, 80:20 y 70:30, respectivamente. Se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos a 15 PSI. El medio se inoculó con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 conidios mL^{-1} , equivalente a 1×10^6 conidios por gramo de arroz seco inicial (conidios gasi^{-1}). El inóculo se obtuvo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio ADS (Descrito en la sección 7.1). Se adicionó agua destilada estéril para ajustar la humedad inicial al 40%, en condiciones asépticas se mezcló con una espátula estéril cada proporción de AP:LA, todas las unidades experimentales (frascos) fueron colocados en un recipiente con tapa hermética con las siguientes dimensiones: 26.6 cm x 11.5 cm x 20 cm, los contenedores tienen válvulas de entrada y salida de aire (Figura 7.2.1), se incubó a 28 °C con fotoperiodo 12:12 (h). La humedad relativa fue del 37 % en todas las mezclas de AP:LA, ya que se inoculó e incubó simultáneamente bajo las mismas condiciones.

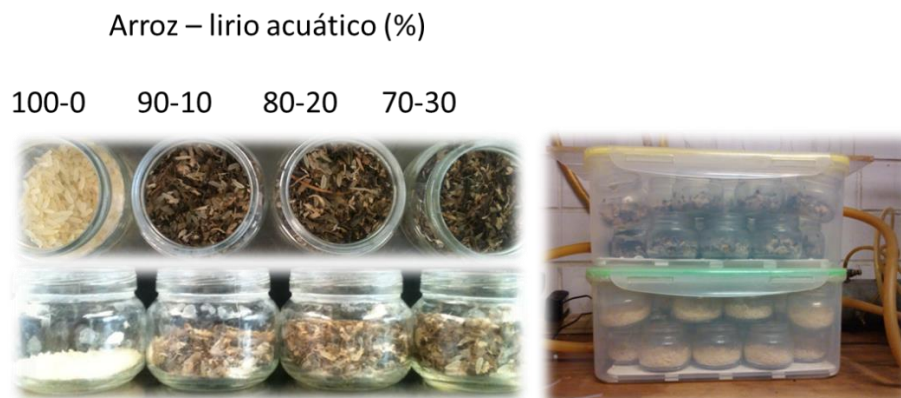


Figura 7.2.1 Unidades experimentales.

7.3 Producción de conidios

Se realizaron cinéticas de producción de conidios durante 8 días, para determinar la producción en cada mezcla de AP:LA se utilizaron 21 unidades experimentales para realizar el conteo de conidios y 3 unidades como control negativo (sin inóculo). Cada 24 h se tomaron tres frascos por tratamiento (replicas), además otros experimentos se realizaron en diferentes tiempos (tres experimentos).

Los conteos de conidios se obtuvieron a partir de los 10 gramos de materia sólida inicial presente en cada frasco. Cada frasco se consideró como una unidad experimental independiente, se realizó la extracción de los conidios utilizando los 10 g de materia sólida contenida en cada frasco, la cual fue transferida a un vaso de precipitados con ayuda de una espátula, los conidios fueron cosechados adicionando un volumen correspondiente de una solución de Tween 80 (0.05 %) (Amresco, Ohio, USA), se agitó durante 10 min con un agitador magnético a 350 rpm (Figura 7.3.1). Fue necesario adicionar diferentes volúmenes de Tween 80 para cada una de las composiciones de AP:LA debido a que la altura del lecho aumentó conforme se incrementó el porcentaje de lirio en la mezcla; para los tratamientos AP:LA (%): 100:0 y 90:10, se utilizaron 60 mL, mientras que para las mezclas AP:LA (%): 80:20 y 70:30, se utilizaron 70 y 80 mL, respectivamente. Después de agitar, se filtró con una gasa estéril de 10 x 10 cm para eliminar los sólidos y así obtener una suspensión de conidios, se realizaron diluciones y se contaron los conidios por medio de una cámara de Neubauer (Marienfield, Germany), con un microscopio (BOECO) y un objetivo 40X. La producción de conidios (C_r) se reportó como conidios por gramo de arroz seco inicial (conidios·gasi⁻¹).

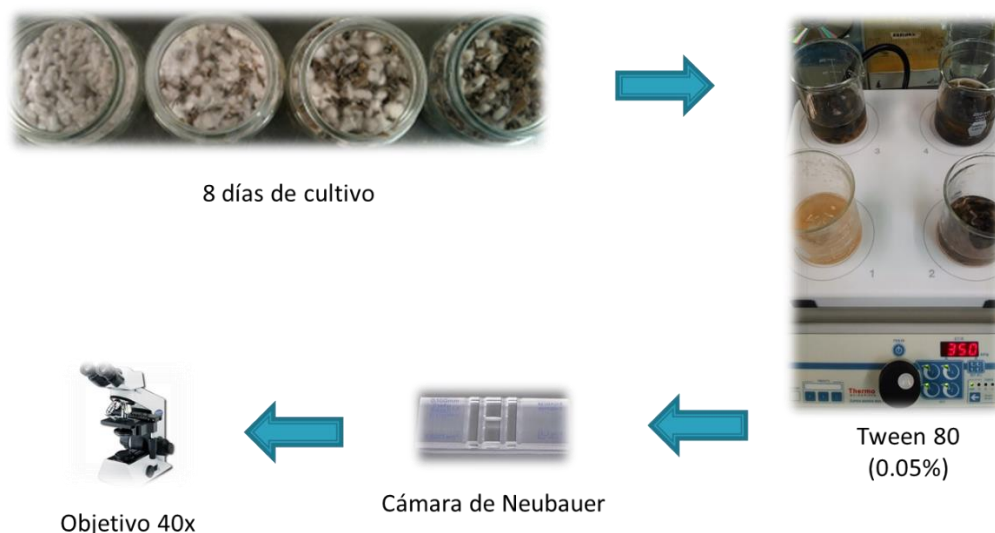


Figura 7.3.1. Extracción y conteo para el conteo de conidios.

7.4 Porosidad y densidad aparente.

Para evaluar la porosidad se utilizaron frascos de vidrio cuyas características fueron descritas anteriormente (sección 7.2), en donde se pesaron 10 gramos de materia sólida y se adicionó la cantidad de agua para obtener el 40% de humedad inicial en cada mezcla de AP:LA (por triplicado); con la finalidad de tener las mismas condiciones iniciales en la cuales se inoculan las cepas de hongos entomopatógenos (Figura 7.4.1). Posteriormente, cada frasco fue aforado con aceite mineral (REASOL®) para determinar la porosidad o fracción vacía (ϵ) que se calculó con la expresión descrita por **Mitchell et al., (2006)**:

$$\epsilon = \frac{(V_t - V_m)}{V_t} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, ϵ es la porosidad o fracción vacía (adimensional), V_t es el volumen total (mL), es decir, es el volumen que ocupa la muestra e incluye el volumen de espacio vacío; V_m es el volumen ocupado solo por la muestra (mL); la diferencia entre V_t y V_m es el volumen vacío (mL). El volumen de espacio vacío fue estimado por el volumen de aceite mineral necesario para cubrir la altura del lecho de empaque; los volúmenes de aceite fueron (mL): 12.7, 21.2, 34 y 45 correspondiente a las mezclas AP:LA (%):100:0, 90:10, 80:20 and 70:30, respectivamente.

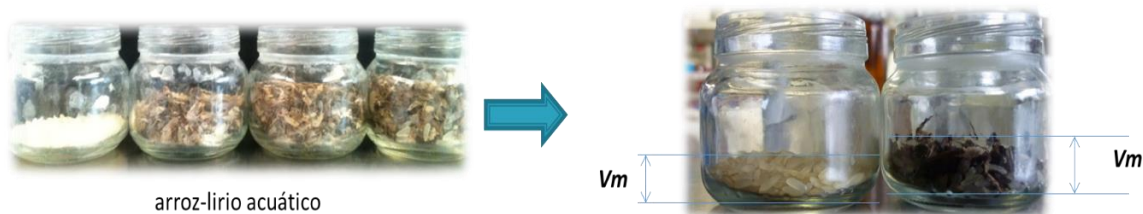


Figura 7.4.1. Determinación del espacio vacío.

La densidad aparente (o densidad de empaque) está definida como la masa de las partículas de un material dividido por el volumen total que ocupa. El volumen total incluye el volumen de las partículas, el volumen de espacio vacío inter-partícula

y el volumen interno de los poros. La densidad aparente se calculó con la siguiente expresión **Mitchell et al., (2006)**:

$$\rho_b = \frac{W_s}{V_t} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde ρ_b es la densidad aparente (g mL⁻¹); W_s es el peso de la muestra (g); V_t es el volumen total ocupado por la muestra (mL).

7.5 Pruebas de viabilidad y germinación.

Para realizar las pruebas de calidad (germinación y viabilidad) se utilizaron los conidios cosechados en el día de mayor producción (día 8), para todas las mezclas de AP:LA y para las tres cepas de hongos entomopatógenos. La extracción de los conidios fue realizada como se describió en la sección 7.3, para determinar el porcentaje de germinación se prepararon cajas Petri con medio ADS (Bioxon, México), posteriormente se estandarizaron suspensiones de conidios a una concentración final de 1x10⁶ conidios mL⁻¹ de donde se tomaron 50 µL y se adicionaron sobre la superficie del medio ADS ya solidificado, con una varilla de vidrio se distribuyó el inóculo y las cajas se incubaron a 28°C durante 12 h, se realizó el conteo al microscopio (BOECO) con objetivo 40X de por lo menos 200 conidios, registrando los conidios germinados y los no germinados (Figura 7.5.1). Se consideró un conidio germinado aquel que presentó la longitud del tubo germinativo al menos dos veces el diámetro del conidio (**Samuels et al., 1989; Ibrahim et al., 2002**). Se realizó la prueba por triplicado para cada mezcla de AP:LA.

Para determinar la viabilidad de los conidios se estandarizaron suspensiones de conidios de cada mezcla de AP:LA a una concentración de 1x10⁴ conidios mL⁻¹ y se adicionaron 30 µL (aproximadamente 300 conidios) de cada suspensión a una caja Petri con medio ADS (Figura 7.5.2). Las cajas se incubaron a 28 °C y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 48 h de cultivo (**Miranda-Hernández et al., 2014**). Se realizó la prueba por triplicado para cada mezcla de AP:LA.

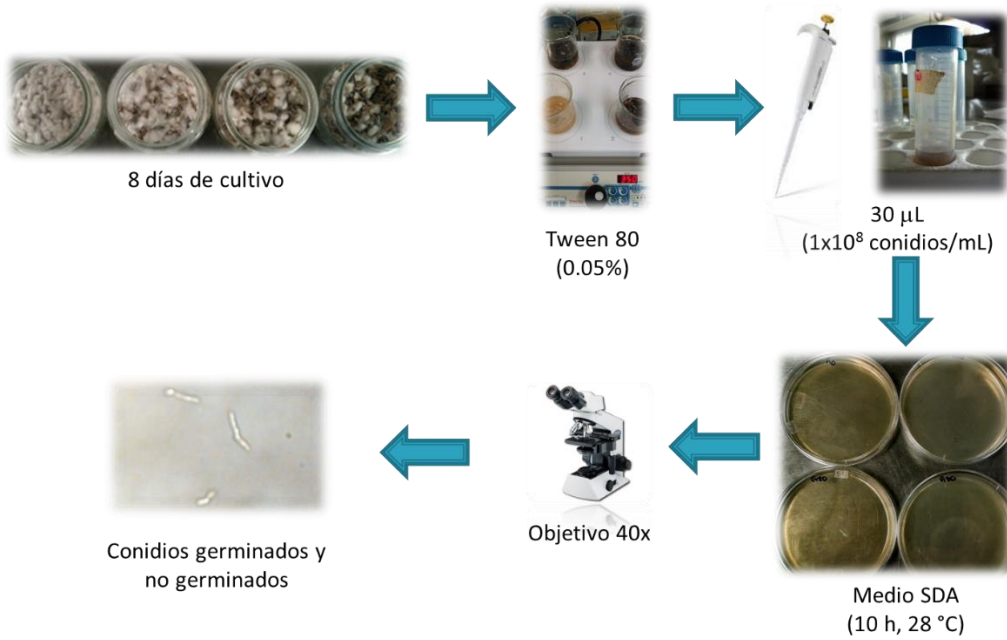


Figura 7.5.1. Determinación de la germinación de los conidios.

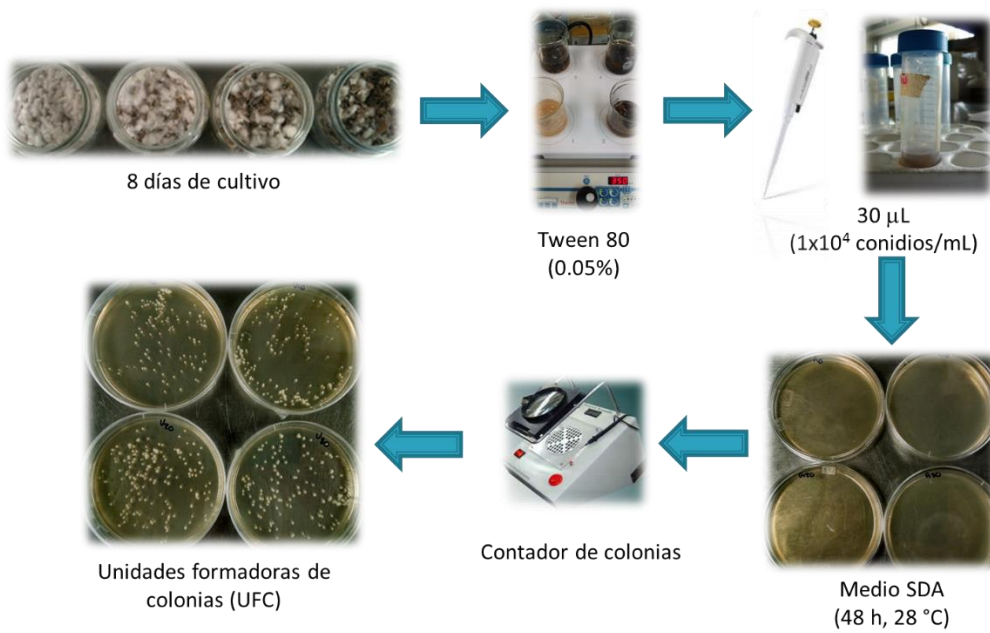


Figura 7.5.2. Determinación de la viabilidad de los conidios.

7.6 Evaluación de la infectividad (Bioensayos)

Los parámetros de infectividad fueron obtenidos mediante la realización de bioensayos, permitiendo la evaluación de la calidad de los conidios producidos por los hongos entomopatógenos estudiados. Para realizar las pruebas de infectividad se utilizaron los conidios cosechados en el día de mayor producción (día 8), para todas las mezclas de AP:LA y para las tres cepas de hongos entomopatógenos. La extracción de los conidios fue realizada como se describió en la sección 7.3. Como insecto modelo para las cepas de *Isaria fumosorosea*, se utilizaron larvas de *Galleria mellonella* (Petmmal, Mexico) con un peso entre 62.2 y 71.6 mg. Para la cepa de *Metarhizium anisopliae*, se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* (Petmmal, Mexico) Se emplearon 7 cajas Petri (5 cajas para larvas infectadas y 2 cajas como control negativo) en donde fueron colocadas 10 larvas en cada caja Petri. Con los conidios aéreos producidos en cada mezcla de AP:LA se prepararon 20 mL de una suspensión con una concentración de 5×10^7 conidios mL^{-1} , en donde fueron sumergidas las larvas de *G. mellonella* por 5 segundos (**Fang et al., 2009**), mientras que las larvas de *T. molitor* durante 15 s (**Montesinos-Matías et al., 2011**); las larvas control fueron sumergidas en una solución de Tween 80 (0.05%) por 5 s y 15 s, respectivamente, después del tratamiento las larvas se alimentaron con dieta para *Wax Worm* (PETMMAL, Mexico) y salvado de trigo (MAXILU, México), para *G. mellonella* y *T. molitor*, respectivamente; con la finalidad de evitar la muerte de las larvas por inanición y se incubaron con fotoperiodo 12:12 (hrs) a 28 °C. La mortalidad fue registrada cada 24 h durante 12 días (Figura 7.6.1).

Con la finalidad de comparar la infectividad de los conidios cosechados de diferentes tratamientos, los parámetros específicos de infectividad se estimaron de acuerdo con el modelo de decaimiento propuesto por **Rodríguez-Gómez et al., (2009)**. Este incluye el tiempo en que aparece la primer larva muerta (t_0), el tiempo letal 50, que es el tiempo en que se alcanza el 50% de mortalidad (TL_{50}) y el porcentaje de sobrevivencia (**S**). El modelo corresponde a la solución de una ecuación diferencial de primer orden con el tiempo de retardo indicado (Figura 7.6.2):

$$\begin{aligned}
 & Y = 100; & \text{Si } 0 \leq t \leq t_0 \\
 & Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S; & \text{Si } t > t_0
 \end{aligned}
 \quad \text{Ecuación 3}$$

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



Figura 7.6.1. Evaluación de la infectividad de los conidios.

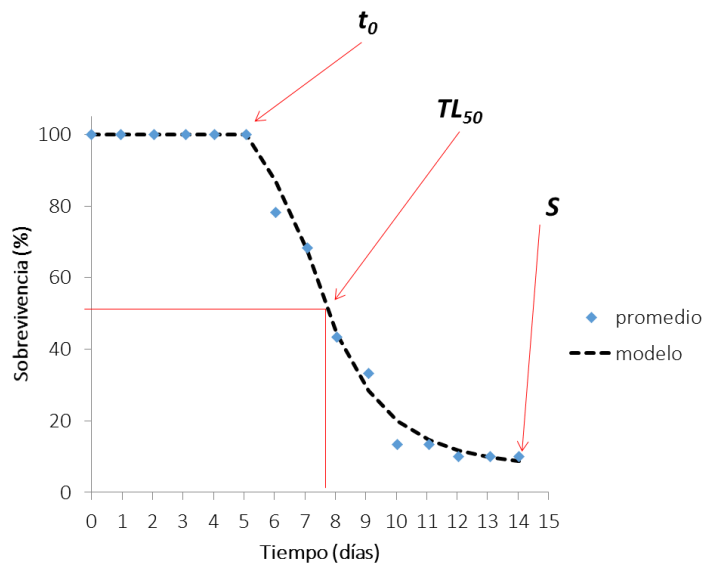


Figura 7.6.2. Ajuste del modelo de decaimiento.

7.7 Análisis de respirometría

Para los análisis de respirometría se utilizaron 6 frascos para cada tratamiento de AP:LA con 10 g de materia sólida cada uno; los frascos se colocaron en un recipiente con tapa hermética cuyas características se describen en la sección 7.2; por la válvula de entrada se hizo pasar una corriente constante de aire con un flujo de 50 mL min^{-1} ajustado y monitoreado con un rotámetro, a la salida del recipiente se conectó a unas trampas de silica gel para retener la humedad y finalmente se conectaron al respirómetro para analizar los gases de salida. Se monitoreo durante 8 días a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los gases de salida fueron analizados con un respirómetro (**Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994**), desarrollado en la UAM-Iztapalapa (Figura 7.7.1), el cual tiene acoplado un analizador de gases (Infrared CO_2 Controller, Fuji Electric Systems Co., Ltd.), que indica el resultado y simultáneamente genera una señal analógica. La señal analógica es enviada a una tarjeta de captura cuya señal es interpretada por un software diseñado con el lenguaje Turbo Pascal, también desarrollado en la UAM-Iztapalapa (Sistema de Monitoreo de CO_2). El analizador emplea un sistema de rayo infrarrojo de no-dispersión. El analizador mide un rango de 0 a 5 % de CO_2 . El equipo fue calibrado con gases al inicio de cada experimento, a 0 % con nitrógeno y con una mezcla de gases que contenía 5 % de CO_2 .



Figura 7.7.1. Instalación del respirómetro para la cuantificación de CO_2 .

7.8 Actividad respiratoria.

Las condiciones requeridas para el crecimiento de la biomasa en un cultivo son: i) un inóculo disponible, ii) una fuente de energía, iii) nutrientes para proporcionar los materiales esenciales de los cuales la biomasa se sintetiza, iv) ausencia de inhibidores que eviten el crecimiento, v) condiciones fisicoquímicas adecuadas (**Pirt, 1975**).

Si todos los requerimientos para el crecimiento son satisfechos, entonces en un intervalo pequeño de tiempo (dt), se espera un aumento en la producción de CO_2 (dx) para ser proporcional a la cantidad de CO_2 (x) presente y para el intervalo de tiempo, es decir:

$$\frac{dx}{dt} = \mu * x$$

El coeficiente diferencial (dx/dt) expresa la tasa de producción de CO_2 en el tiempo, integrando la ecuación anterior y reordenando se obtiene la ecuación 7.8.1. A menudo hay un retraso antes de que la tasa específica de producción de CO_2 alcanza su valor máximo. La duración de este retardo (tiempo lag, F_{lag}) se calculó de la gráfica de logaritmo de la producción de CO_2 , la línea recta es extrapolada al nivel de la producción de CO_2 inicial y la intersección del eje del tiempo se toma como el tiempo lag.

En la sección 8.1.4, se estimaron algunos parámetros cinéticos que fueron calculados utilizando el modelo exponencial (**Pirt, 1975**):

Ecuación 7.8.1
$$X = X_0 * e^{\mu * t}$$

En donde X es la producción de CO_2 en el tiempo ($mg CO_2 gasi^{-1}$), X_0 es la producción de CO_2 inicial ($mg CO_2 gasi^{-1}$), μ es la tasa específica de producción de CO_2 (h^{-1}), t es el tiempo (h).

De los análisis de respirometría, se obtuvieron algunos parámetros cinéticos de las lecturas en línea de CO_2 en cada mezcla de AP:LA, para ello se utilizó el modelo descrito por **Lareo et al., (2006)**. En donde se propone una ecuación para estimar los valores de $X(t)$ de las mediciones de dCO_2/dt , haciendo una combinación entre el modelo logístico (frecuentemente utilizado para describir el crecimiento fúngico) y el modelo de crecimiento de **Pirt, (1975)**, se obtiene la siguiente ecuación:

Ecuación 7.8.2

$$R = R_A \left\{ \frac{Ae^{-\mu t}}{1 + Ae^{-\mu t}} + m^* \right\} \left\{ \frac{1}{1 + Ae^{-\mu t}} \right\}$$

De la ecuación 7.8.2, se desprenden cuatro parámetros:

Parámetro 1 $R_A = \frac{\mu * X_{m\acute{a}x}}{Y_{X/C}}$

En donde R_A es la tasa de producción de CO_2 máxima ($mg\ CO_2\ h^{-1}$), $X_{m\acute{a}x}$ es la cantidad de producción de CO_2 máxima ($mg\ CO_2\ gasi^{-1}$)

Parámetro 2 μ

En donde μ es la tasa específica de producción de CO_2 , cuyas unidades son h^{-1} .

Parámetro 3 $A = \frac{X_{m\acute{a}x}}{X_0 - 1}$

En donde A , es un parámetro adimensional que relaciona la producción de CO_2 máxima ($X_{m\acute{a}x}$) y la producción de CO_2 inicial (X_0), ambos parámetros tienen unidades de $mg\ CO_2\ gasi^{-1}$.

Parámetro 4
$$m^* = \frac{m \cdot Y_{X/C}}{\mu}$$

En donde m^* es un parámetro adimensional que relaciona el coeficiente de crecimiento $Y_{X/C}$ ($mg\ CO_2\ mg\ CO_2^{-1}$) multiplicado por la constante m llamada coeficiente de mantenimiento ($mg\ CO_2\ mg\ CO_2^{-1}\ h^{-1}$), dividido entre la tasa específica de producción de CO_2 (h^{-1}).

Relacionando los parámetros 1 y 4 se obtiene el siguiente parámetro:

Parámetro 5
$$R_e = R_{m\acute{a}x} * m$$

En donde R_e es la tasa de producción de CO_2 asociada a mantenimiento ($mg\ CO_2\ g\ asi^{-1}$), tales funciones de mantenimiento son: recambio de material celular, trabajo osmótico para mantener gradientes entre la célula y su exterior y movimiento celular.

7.9 Análisis estadístico.

Para las tres cepas de hongos entomopatógenos estudiados, los resultados obtenidos en la producción de conidios, porosidad, densidad aparente, viabilidad, germinación y los parámetros de infectividad, se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de Tukey para la comparación de medias ($p < 0.05$). Para todos los análisis se utilizó el software SPSS (SPSS, Chicago, IL).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 ETAPA UNO

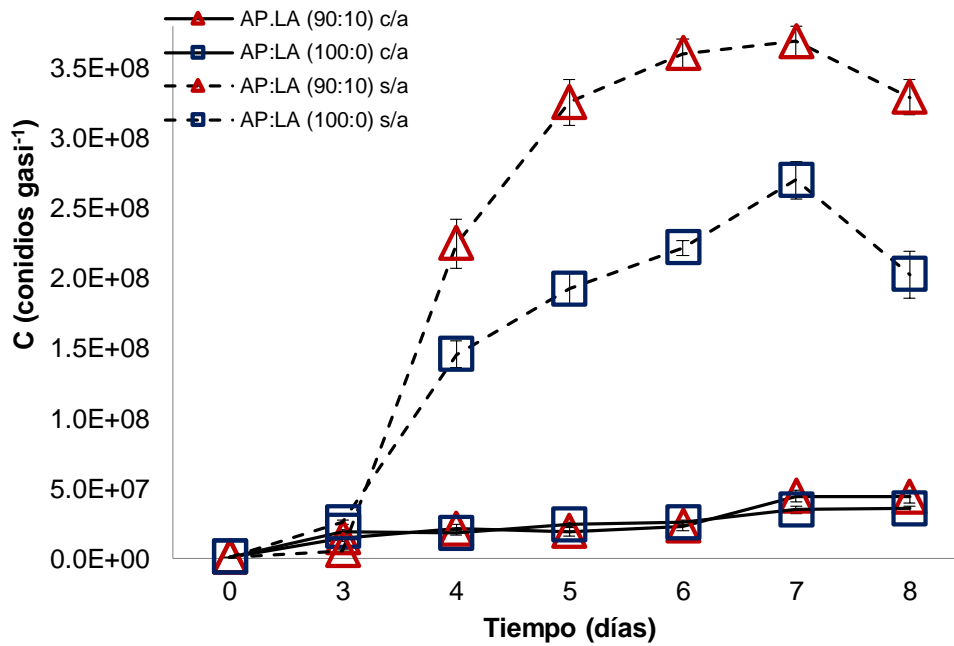
En este capítulo se presentan los resultados encontrados sobre el efecto de la incorporación del lirio acuático como texturizante y de la aireación, ambos sobre la producción de conidios, parámetros de calidad, infectividad y cinéticos, de *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea* CNRCB1, utilizando dos mezclas de arroz precocido – lirio acuático (100-0 y 90-10).

8.1.1 Producción de conidios con y sin aireación en dos mezclas de AP:LA

El efecto de la aireación sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX se presenta en el Gráfica 8.1.1.1, las unidades experimentales fueron frascos de vidrio, cuyas características y condiciones de cultivo se describen en las secciones 7.2 y 7.3. Se encontró una mayor producción de conidios en los experimentos sin aireación en comparación con el rendimiento alcanzado en aquellos donde se empleó aireación. De los resultados obtenidos sin aireación, hubo un incremento del rendimiento a partir del tercer día, alcanzando la mayor producción en el día 7, sin embargo, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en los máximos rendimientos siendo de 2.7×10^8 conidios gasi^{-1} y de 3.6×10^8 conidios gasi^{-1} , para AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente. Por otro lado, con aireación no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la producción alcanzada, siendo de 9.4×10^7 conidios gasi^{-1} y de 1×10^8 conidios gasi^{-1} , para AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente.

En la Tabla 8.1.1.1 se resumen los valores de producción de conidios en el día 7 para ambas mezclas de AP:LA, sin aireación la producción obtenida en AP:LA (90:10) incrementó en un 33%, con respecto a la obtenida en AP:LA (100:0), por otro lado, al utilizar aireación la producción obtenida en AP:LA (90:10) incrementó en un 33%, con respecto a la obtenida en AP:LA (100:0). Los resultados muestran que hay un efecto negativo de la aireación sobre la producción de conidios de *M.*

anisopliae CP-OAX, sin embargo, hay un efecto positivo al incrementar la producción de conidios con la incorporación del lirio acuático.



Gráfica 8.1.1.1. Producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA); con y sin aireación (c/a y s/a).

Tabla 8.1.1.1. Producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en 7 días.

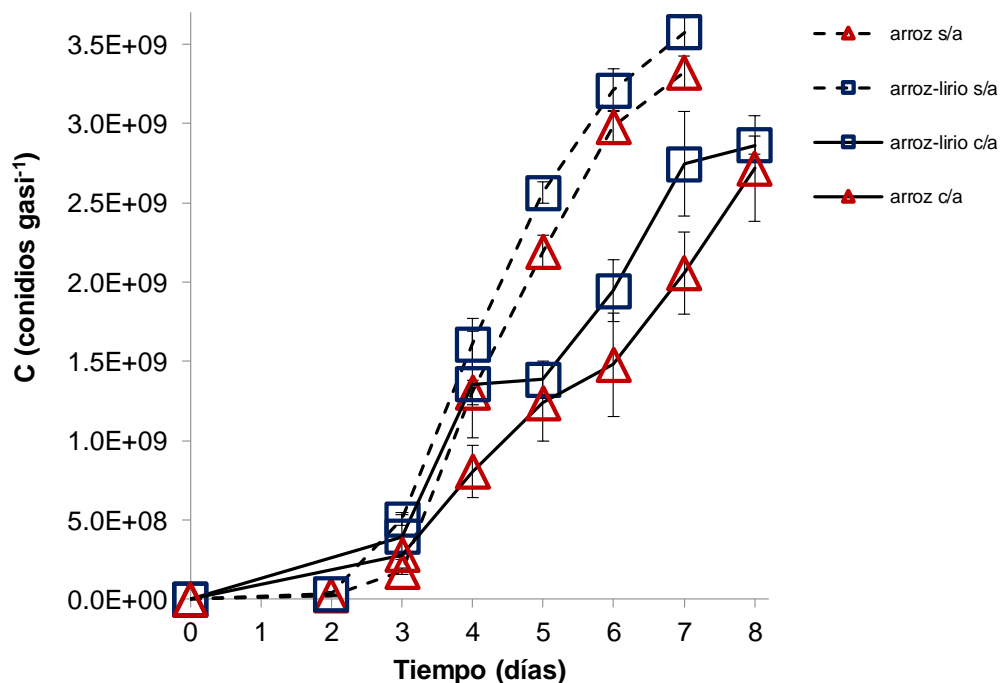
Tratamiento	Mezcla AP:LA	C_a^*
		(conidios gasi^{-1}) 1×10^8
Sin aireación	100:0	2.7 ± 0.13^b
	90:10	3.6 ± 0.11^a ($\uparrow 33\%$)
Con aireación	100:0	0.9 ± 0.06^b
	90:10	1.2 ± 0.93^a ($\uparrow 33\%$)

^{a,b} Los valores promedio en la misma columna con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

* Conidios por gramo de arroz seco inicial.

El efecto de la aireación sobre la producción de conidios para *Isaria fumosorosea* CNRCB1 se muestra en el Gráfica 8.1.1.2, se encontró una mayor producción de conidios en los experimentos sin aireación forzada en comparación con el rendimiento alcanzado en aquellos donde se aplicó aireación, además la mayor producción de conidios se alcanzó a los 7 días. Sin aireación, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en los máximos rendimientos siendo de 3.3×10^9 conidios gasi^{-1} y de 3.6×10^9 conidios gasi^{-1} , para AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente.

Por otro lado, con aireación no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la producción alcanzada, con valores de 2.7×10^9 conidios gasi^{-1} y de 2.9×10^9 conidios gasi^{-1} , para AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente. De la misma manera que con *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, se observó que la aireación afectó negativamente la producción de conidios.



Gráfica 8.1.1.2. Producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA); con y sin aireación (c/a y s/a).

En la Tabla 8.1.1.2 se resumen los valores de producción de conidios a los 7 días de cultivo para ambas mezclas de AP:LA, en los experimentos sin aireación la producción obtenida en AP:LA (90:10) incrementó un 9%, por otro lado, con aireación no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en la producción de conidios. Los resultados muestran que hay un efecto negativo de la aireación sobre la producción de conidios de *Isaria fumosorosea* CNRCB1, sin embargo, hay un efecto positivo al incrementar la producción de conidios con la incorporación del lirio acuático.

Tabla 8.1.1.2. Producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 en 7 días.

Tratamiento	Mezcla AP:LA	C_a^*
		(conidios gasi^{-1}) 1×10^9
Sin aireación	100:0	3.3 ± 0.09^b
	90:10	3.6 ± 0.09^a (↑ 9%)
Con aireación	100:0	2.7 ± 0.33^a
	90:10	2.9 ± 0.05^a (↑ 7%)

A,B,a,b Los valores promedio en la misma columna con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p<0.05$).

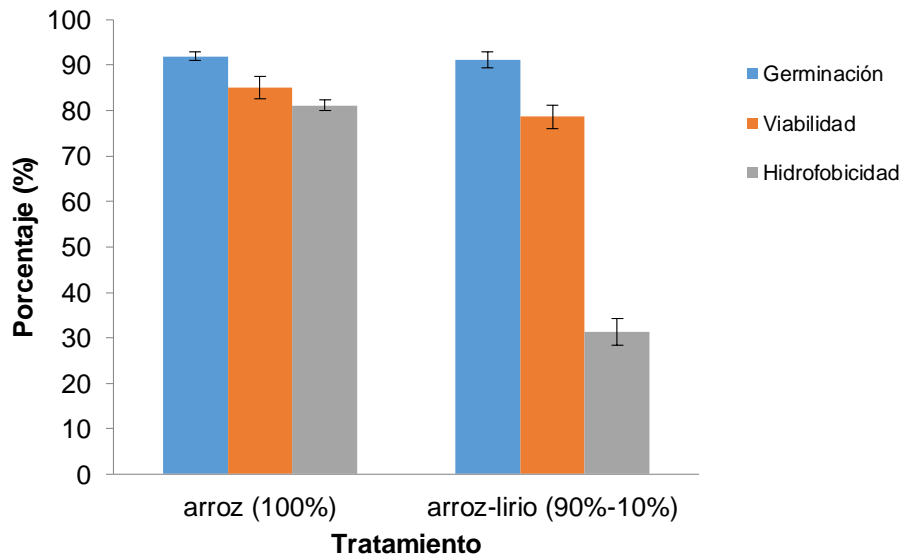
* Conidios por gramo de arroz seco inicial.

8.1.2 Pruebas de calidad de los conidios obtenidos

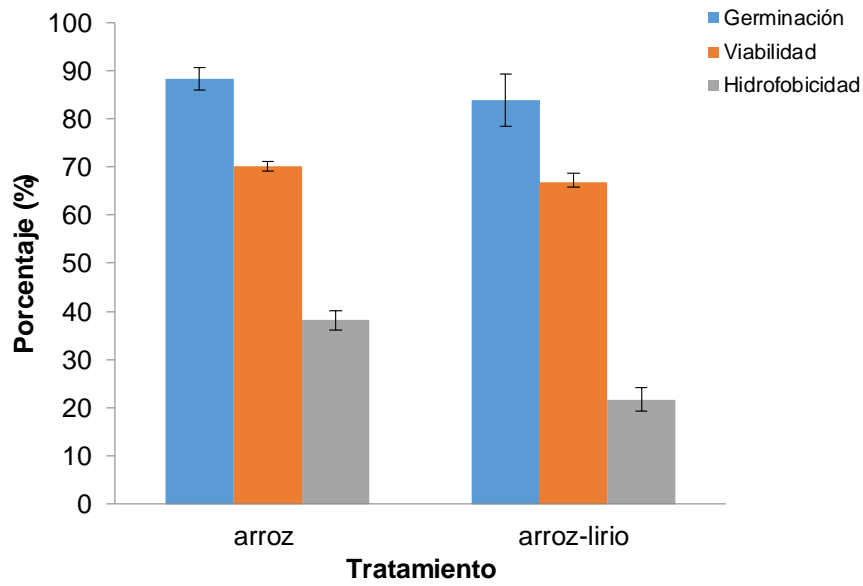
Los resultados encontrados en los parámetros de calidad para la cepa *M. anisopliae* CP-OAX, se presentan en las Gráficas 8.1.2.1 y 8.1.2.2. Sin aireación forzada y en ambas mezclas de AP:LA, no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en los porcentajes de germinación, siendo en promedio del 91%. De manera opuesta, para ambas mezclas AP:LA se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) en la viabilidad e hidrofobicidad, con valores 85% y 78% para la viabilidad

y del 81% y 31% para la hidrofobicidad, lo que demuestra un efecto negativo del lirio acuático como texturizante para la viabilidad e hidrofobicidad de esta cepa.

Por otro lado, con aireación y en ambas mezclas de AP:LA no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en los porcentajes de germinación, siendo del 88% y 83% para las mezclas AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente. En cambio, para ambas mezclas AP:LA se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) en la viabilidad e hidrofobicidad, con valores 70% y 66% para la viabilidad y del 38% y 21% para la hidrofobicidad. Los resultados muestran el efecto negativo de la aireación sobre la disminución de los parámetros de calidad (V, G, y H), además la incorporación del lirio acuático tiene un efecto negativo sobre la hidrofobicidad.

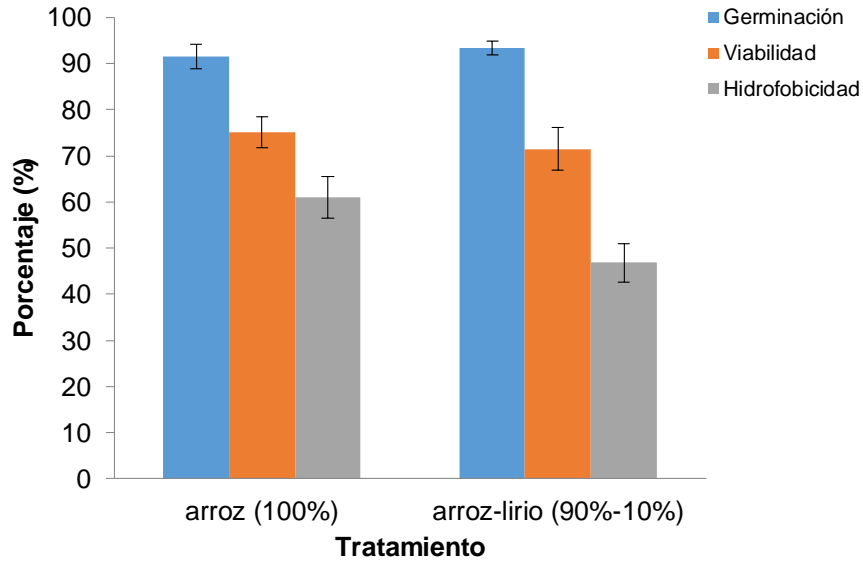


Gráfica 8.1.2.1. Parámetros de calidad en conidios de *M. anisopliae* CP-OAX, producidos en 6 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), sin aireación.

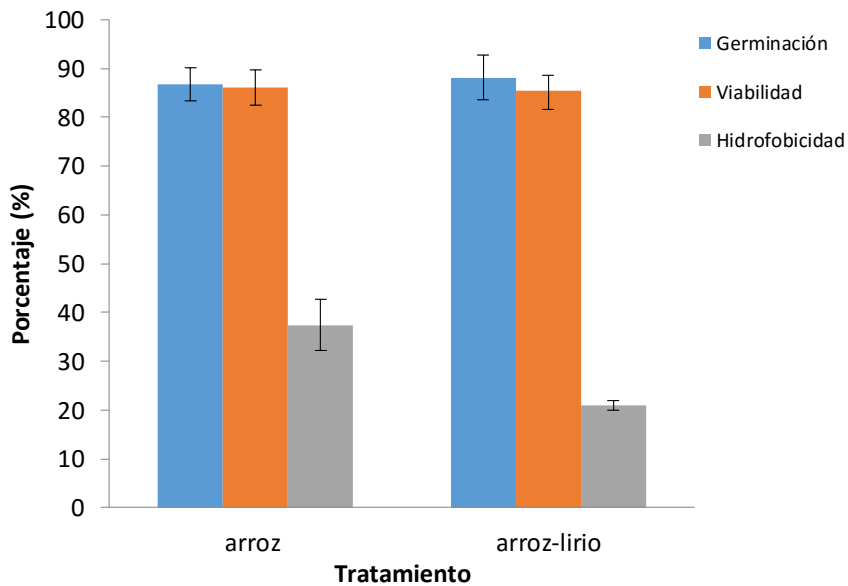


Gráfica 8.1.2.2. Parámetros de calidad en conidios de *M. anisopliae* CP-OAX, producidos en 6 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), con aireación.

Los resultados encontrados para los parámetros de calidad para la cepa *I. fumosorosea* CNRCB1, se presentan en las Gráficas 8.1.2.3 y 8.1.2.4. Sin aireación y en ambas mezclas de AP:LA, no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en los porcentajes de germinación y viabilidad, con valores en promedio del 92% y 73%, respectivamente. Contrariamente, para la hidrofobicidad, se encontró diferencia significativa ($p<0.05$), con valores 61% y 47% para las mezclas AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente. Por otro lado, con aireación y en ambas mezclas de AP:LA no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) en los porcentajes de germinación y viabilidad, siendo del 87% y 85%, respectivamente. En cambio, para ambas mezclas AP:LA se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) en la hidrofobicidad, con valores del 37% y 21% en las mezclas AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10), respectivamente. Los resultados reflejan el efecto negativo de la aireación sobre la disminución de los parámetros de calidad (G y H), además la incorporación del lirio acuático repercute en la disminución de la hidrofobicidad, lo cual también se observó con *M. anisopliae* CP-OAX.



Gráfica 8.1.2.3. Parámetros de calidad en conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1, producidos en 7 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), sin aireación.



Gráfica 8.1.2.4. Parámetros de calidad en conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1, producidos en 7 días sobre mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA), con aireación.

8.1.3 Pruebas de infectividad

Las pruebas de infectividad de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX se realizaron en larvas de *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella*, los parámetros de infectividad encontrados en cada insecto hospedero se muestran en las Tablas 8.1.3.1 y 8.1.3.2, respectivamente. En todos los tratamientos se utilizaron conidios

obtenidos a los 6 días de cultivo. Cuando se realizaron las pruebas con *T. molitor* y usando conidios obtenidos de cultivos sin aireación (Tabla 8.1.3.1), en ambas mezclas de AP:LA se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en los valores de t_0 , pero no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en el TL_{50} y S . Asimismo, en conidios de ambas mezclas de AP:LA obtenidos en cultivos con aireación, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en t_0 , sin embargo en la mezcla AP:LA (90:10) no se alcanzó el TL_{50} , por consiguiente hubo un mayor porcentaje de sobrevivencia (70%), lo que explica la diferencia significativa ($p < 0.05$) en S .

Tabla 8.1.3.1. Parámetros de infectividad de *M. anisopliae* CP-OAX en larvas de *T. molitor*, utilizando conidios cosechados a los 7 días.

Tratamiento	Mezcla AP:LA	t_0 *	TL_{50} **	S ***
		(d)	(d)	(%)
Sin aireación	100:0	4.85±0.19 ^a	8.32±2.05 ^a	8.33±1.71 ^a
	90:10	6.30±0.86 ^b	7.67±1.19 ^a	6.67±1.34 ^a
Con aireación	100:0	6.98±0.48 ^b	10.09±1.84 ^a	26.67±3.12 ^b
	90:10	7.60±1.62 ^b	-	70.00±3.76 ^c

* Tiempo de retardo, es el tiempo que tarda en aparecer la primera larva muerta.

** Tiempo letal medio, cuando se alcanza el 50% de mortalidad.

*** Porcentaje de sobrevivencia.

^{a,b} Los valores promedio por tratamiento en la misma columna, con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 8.1.3.2. Parámetros de infectividad de *M. anisopliae* CP-OAX en larvas de *G. mellonella*, utilizando conidios cosechados a los 7 días.

Tratamiento	Mezcla AP:LA	t_o *	TL_{50} **	S ***
		(d)	(d)	(%)
Sin aireación	100:0	6.27±1.30 ^a	7.96±1.27 ^a	7.50±0.69 ^a
	90:10	6.14±1.21 ^a	9.02±1.26 ^a	15.0±1.45 ^b
Con aireación	100:0	6.06±0.91 ^a	8.38±0.79 ^a	12.5±2.21 ^b
	90:10	6.17±0.89 ^a	7.81±0.83 ^a	10.0±1.19 ^b

* Tiempo de retardo, es el tiempo que tarda en aparecer la primera larva muerta.

** Tiempo letal medio, cuando se alcanza el 50% de mortalidad.

*** Porcentaje de sobrevivencia.

^{a,b} Los valores promedio por tratamiento en la misma columna, con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los parámetros de infectividad obtenidos con los bioensayos realizados en larvas de *Galleria mellonella* se muestran en la Tabla 8.1.3.2, en ambas mezclas de AP:LA se encontró que los conidios producidos sin aireación no mostraron diferencia significativa ($p > 0.05$) en t_o y TL_{50} , sin embargo, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en **S**, con el valor menor de 7.5% en AP:LA (100:0). Por otro lado, en los conidios producidos con aireación no hubo diferencia significativa en los parámetros de infectividad t_o , TL_{50} y **S** para en ambas mezclas de AP:LA.

Las pruebas de infectividad de los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 se realizaron en larvas de *Galleria mellonella*, para los bioensayos se utilizaron dos concentraciones diferentes con la finalidad de encontrar diferencias entre los parámetros de infectividad obtenidos para cada tratamiento, las concentraciones de inóculo fueron 1×10^8 conidios mL^{-1} y de 5×10^7 conidios mL^{-1} , sin embargo, no se encontró diferencia, por lo tanto, se recomienda disminuir la concentración de inóculo a 1×10^7 conidios mL^{-1} , los parámetros de infectividad encontrados se muestran en las Tablas 8.1.3.3 y 8.1.3.4. Los resultados muestran que los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 producidos en las mezclas de AP:LA (100:0) y AP:LA (90:10) con o sin aireación, son altamente infectivos en larvas de *G. mellonella* ya que no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en los parámetros de

infectividad t_o , TL_{50} y S realizando bioensayos en 2 concentraciones diferentes, por otro lado, se recomienda realizar otro bioensayo disminuyendo la concentración del inóculo a 1×10^7 conidios mL^{-1} , dado que esto ayudaría a discriminar las cepas y el posible efecto del texturizante y la aireación.

Tabla 8.1.3.3. Parámetros de infectividad de *I. fumosorosea* CNRCB1 en larvas de *G. mellonella*, utilizando un inóculo de 1×10^8 conidios mL^{-1} .

Tratamiento	Mezcla AP:LA	t_o *	TL_{50} **	S ***
		(d)	(d)	(%)
Sin aireación	100:0	3.55±0.68 ^a	3.75±0.66 ^a	0
	90:10	3.91±0.91 ^a	4.15±0.92 ^a	0
Con aireación	100:0	3.87±0.59 ^a	4.16±0.61 ^a	0
	90:10	4.08±0.93 ^a	4.34±0.84 ^a	0

* Tiempo de retardo, es el tiempo que tarda en aparecer la primera larva muerta.

** Tiempo letal medio, cuando se alcanza el 50% de mortalidad.

*** Porcentaje de sobrevivencia.

^{a,b} Los valores promedio por tratamiento en la misma columna, con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 8.1.3.4. Parámetros de infectividad de *I. fumosorosea* CNRCB1 en larvas de *G. mellonella*, utilizando un inóculo de 5×10^7 conidios mL^{-1} .

Tratamiento	Mezcla AP:LA	t_o *	TL_{50} **	S ***
		(d)	(d)	(%)
Sin aireación	100:0	3.93±0.92 ^a	4.06±1.02 ^a	0
	90:10	3.70±1.55 ^a	3.93±1.63 ^a	0
Con aireación	100:0	4.24±1.40 ^a	4.71±1.25 ^a	0
	90:10	3.73±0.39 ^a	4.05±0.70 ^a	0

* Tiempo de retardo, es el tiempo que tarda en aparecer la primera larva muerta.

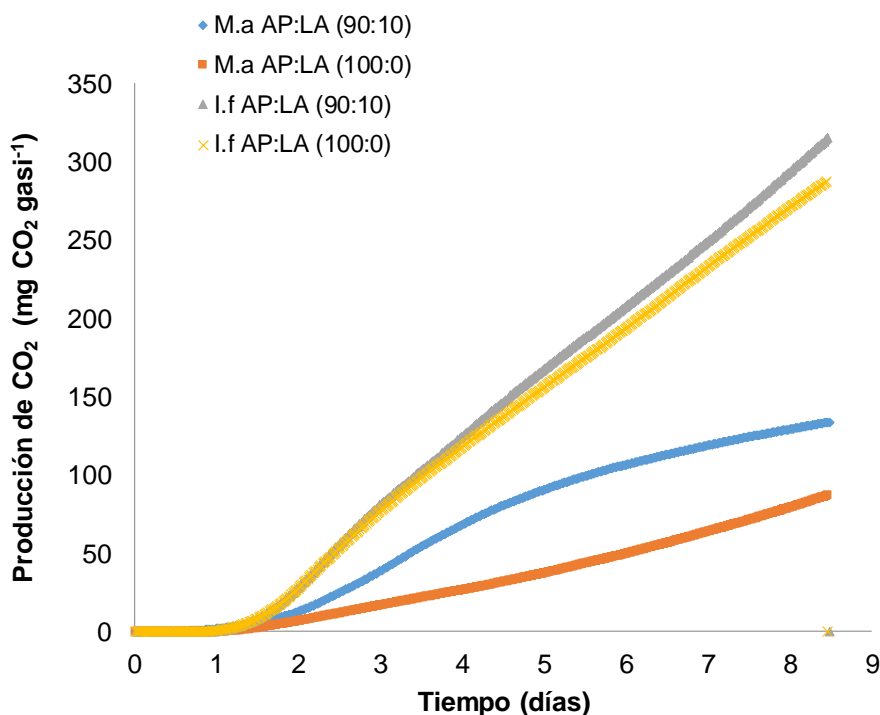
** Tiempo letal medio, cuando se alcanza el 50% de mortalidad.

*** Porcentaje de sobrevivencia.

^{a,b} Los valores promedio por tratamiento en la misma columna, con diferente letra indican diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

8.1.4 Análisis respirométrico

La técnica de respirometría ha sido utilizada para monitorear la actividad metabólica de hongos en cultivos sólidos (**Braga et al., 1999; Rahardjo et al., 2002; Barranco-Florido et al., 2002; Arzumanov et al., 2005**). Para las cepas *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX, se observaron tendencias similares en la evolución de CO₂ (Gráfica 8.1.4.1); inicialmente una etapa en donde no hay producción de CO₂, posiblemente asociada a la fase lag (*f_{lag}*) que describe que los hongos están metabólicamente activos sin estar creciendo, posteriormente una fase de producción de CO₂ acelerada (fase exponencial) y finalmente una etapa lineal. La fase lag fue calculada trazando una línea recta en la fase de crecimiento lineal intersectando con el eje x, mientras que la tasa de producción de CO₂ corresponde a la pendiente de la fase lineal y para calcular la tasa específica de producción de CO₂ se utilizó el modelo exponencial tomando como criterio para su cálculo utilizar los datos hasta un tiempo equivalente a dos veces la fase lag.



Gráfica 8.1.4.1. Producción de CO₂ por *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA) durante 9 días de cultivo.

Los análisis de respirometría permitieron calcular los parámetros cinéticos que se presentan en la Tabla 8.1.4.1. Para *M. anisopliae* CP-OAX le toma casi 42 horas su fase lag en la mezcla AP:LA (90:10), la cual es mayor en comparación con la mezcla AP:LA (100:0), la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) es ligeramente menor en AP:LA (90:10), de forma indirecta nos indica el tiempo que tarda en duplicarse la cepa en cada tratamiento, por otro lado, su tasa de producción de CO₂ (V_{CO_2}) es 3 veces mayor, lo que se refleja en una mayor producción de CO₂ y se puede pensar que está asimilando mejor el sustrato (arroz) en la mezcla AP:LA (90:10), también indica que tan rápido convierte la fuente de carbono a CO₂.

Para *I. fumosorosea* CNRCB1 el tiempo de la fase lag (f_{lag}), la tasa específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) y la tasa de producción de CO₂ en ambas mezclas de AP:LA son muy similares, sin embargo hay un ligero incremento en la producción de CO₂ acumulada en la mezcla AP:LA (90:10), lo que sugiere que este hongo asimila mejor el sustrato en ésta mezcla de AP:LA.

Tabla 8.1.4.1. Parámetros cinéticos obtenidos por respirometría para los hongos *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1.

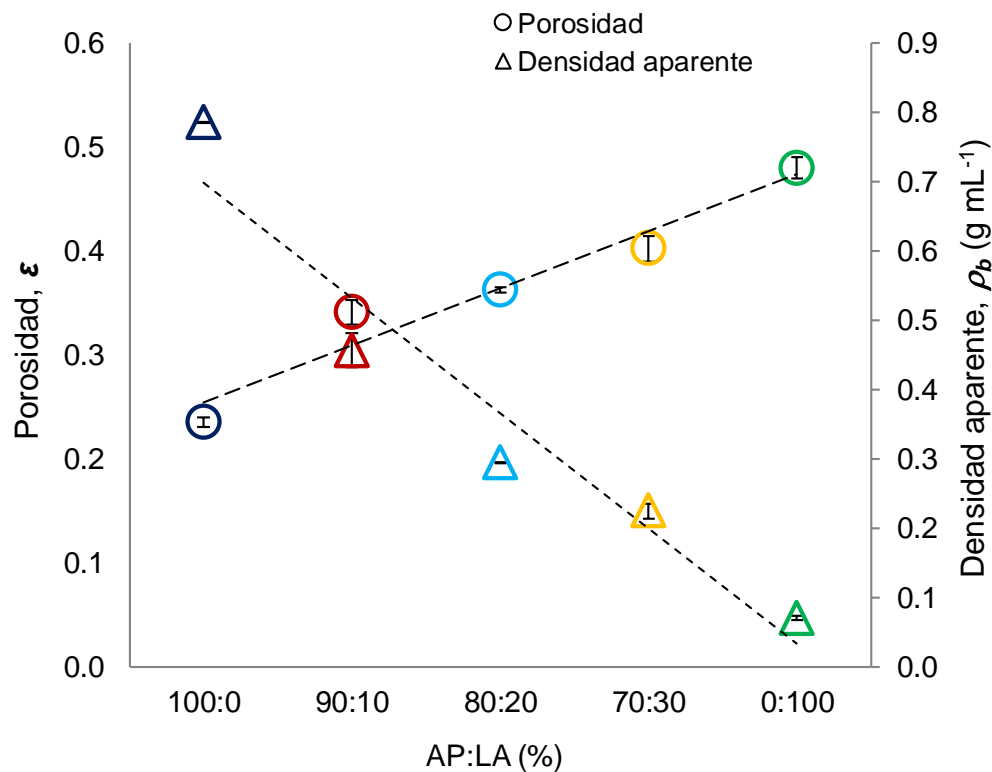
Hongo	Mezcla AP:LA	f_{lag} (h)	μ_{CO_2} (h ⁻¹)	V_{CO_2} mg CO ₂ gasi ⁻¹ h ⁻¹
<i>M. anisopliae</i>	100:0	33.0	0.06	0.4
	90:10	41.9	0.04	1.2
<i>I. fumosorosea</i>	100:0	35.7	0.06	2.1
	90:10	36.1	0.06	2.2

8.2 ETAPA DOS

En este capítulo se presentan los resultados encontrados acerca del efecto de las proporciones de AP:LA en la porosidad del lecho de empaque, a su vez, el efecto de la porosidad sobre la producción de conidios, parámetros de calidad e infectividad de dos cepas *I. fumosorosea* y una de *M. anisopliae*.

8.2.1 Efecto de las proporciones AP:LA sobre la porosidad del lecho de empaque

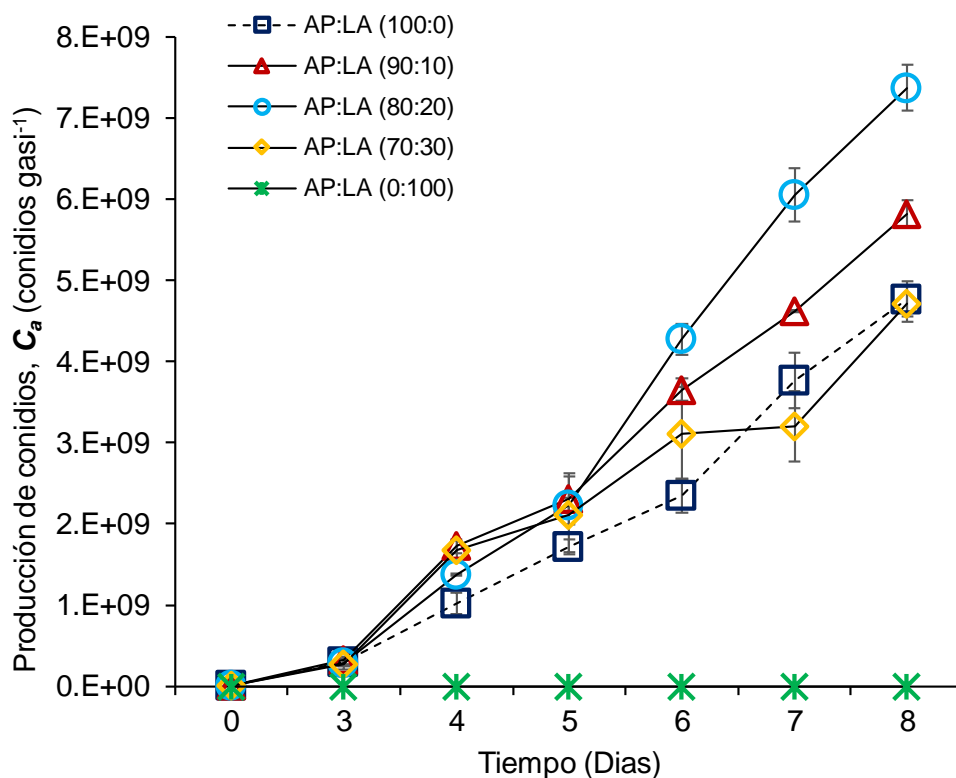
La incorporación del lirio acuático en mezclas con arroz incrementó significativamente ($p < 0.05$) la porosidad (ϵ), y en consecuencia disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la densidad aparente (Gráfica 8.2.1.1); en ambos parámetros se encontró una correlación lineal cuyas ecuaciones y coeficientes de correlación fueron, $Y = 0.0051 * X + 0.1989$; $R^2 = 0.947$ y $Y = -0.1663 * X + 0.8653$; $R^2 = 0.931$, respectivamente.



Gráfica 8.2.1.1. Porosidad (círculos) y densidad aparente (triángulos) en mezclas de arroz precocido-lirio acuático (AP:LA). La correlación lineal se indica como línea punteada.

8.2.2 Efecto de la porosidad sobre la producción de conidios

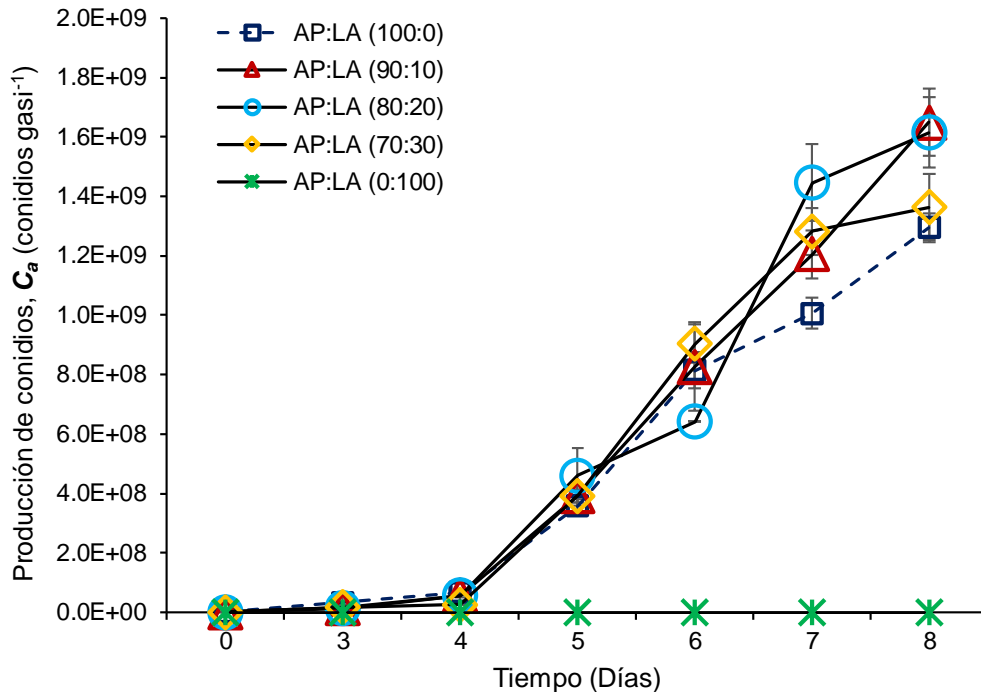
Las cinéticas de producción de conidios para las cepas de *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 y la CNRCB1 se muestran en las Gráficas 8.2.2.1 y 8.2.2.2, respectivamente. En ambas cepas la máxima producción de conidios se observó en el día 8 para todas las mezclas de arroz precocido-lirio acuático (AP:LA). Para la cepa CNRCB1 los niveles de producción fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), con un incremento de 1.33 veces para las mezclas 90:10 y 80:20. De forma similar, para la cepa ARSEF3302 en la mezcla 80:20 se alcanzó los más altos niveles de producción, con un incremento de 1.55 veces comparado con el control. Sin embargo, para ambas cepas en la mezcla 70:30 hubo niveles de conidiación similares al tratamiento sin texturizante (AP:LA=100:0) ($p > 0.05$).



Gráfica 8.2.2.1. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).

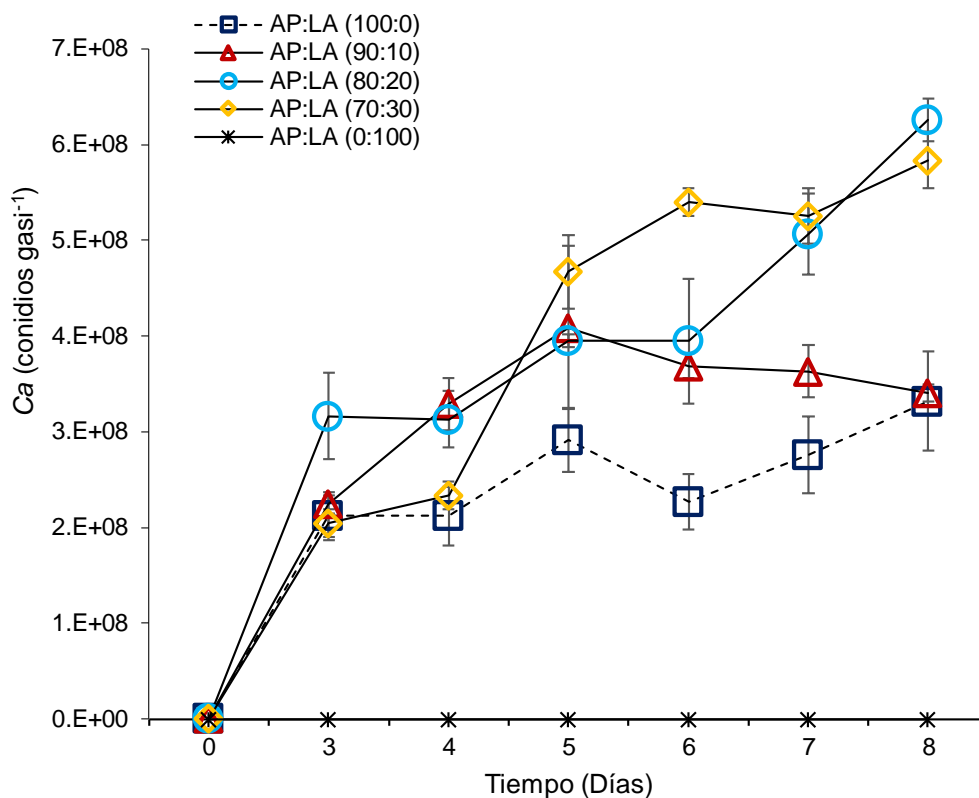
Se ha reportado la producción de conidios de las cepas *Isaria fumosorosea* del orden de 1×10^9 conidios por gramo de sustrato sólido inicial (Kim *et al.*, 2010;

Moura-Mascarin et al., 2010). Los resultados obtenidos en esta investigación han sido en un intervalo de 1.3×10^9 a 6.9×10^9 conidios por gramo de arroz seco inicial. Esto es un buen resultado, considerando que la dosis propuesta es de 1×10^{13} conidios asperjados por hectárea (**Jackson et al., 2010**), por lo que solamente se requiere de 1.5 a 8 Kg de substrato (granos de arroz) para producir la dosis recomendada de conidios para un solo tratamiento en campos de cultivo.



Gráfica 8.2.2.2. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa *Isaria fumosorosea* CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).

Se realizaron cinéticas de producción de conidios para la cepa de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX las cuales se muestran en la Gráfica 8.2.2.3. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en la producción alcanzada en los tratamientos AP:LA=100:0 y 90:10, con una producción promedio de $\approx 3 \times 10^8$ conidios gasi^{-1} . De forma análoga no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) con las mezclas AP:LA=80:20 y 70:30, con una producción de $\approx 6 \times 10^8$ conidios gasi^{-1} . Sin embargo, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en la producción de conidios en las mezclas AP:LA=80:20 y 70:30, con un incremento de 2 veces comparado con los tratamientos AP:LA=100:0 y 90:10.



Gráfica 8.2.2.3. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).

El lirio acuático fue incorporado como un texturizante para evitar la compactación del sustrato basado en arroz, con ello se incrementa la porosidad (ϵ) del lecho y en consecuencia se promueve la transferencia de oxígeno. El impacto de este texturizante sobre la producción de conidios fue analizado. Cuando se utilizó una mezcla con 30% de texturizante, la producción de conidios por gramo de arroz seco inicial fue menor comparado con los otros tratamientos, además, no hubo diferencia significativa con el control (AP:LA=100:0). Éste comportamiento ya fue observado con *Beauveria bassiana*, con altas proporciones de texturizante (bagazo de caña de azúcar) se reduce la producción de conidios por gramo de materia sólida total. En contraste, no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando la producción de conidios fue reportada por gramo de salvado de trigo (sustrato principal) (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010). En este estudio, ambas cepas de *Isaria fumosorosea*

crecieron principalmente sobre los granos de arroz (el arroz fue el único sustrato), no se observó crecimiento significativo o apreciable sobre el lirio acuático (Figura 8.2.2.1), tampoco se observó conidiación de ambas cepas de *Isaria fumosorosea* sobre las partículas del lirio acuático (AP:LA=0:100). **Arzumanov et al. (2005)** reportaron resultados similares en cultivo en soporte sólido usando arroz como sustrato y bagazo de caña como texturizante (50:50), observaron que *Metarhizium anisopliae* creció casi exclusivamente sobre los granos de arroz. Para ambas cepas de *I. fumosorosea*, se realizaron experimentos utilizando solamente lirio acuático (AP:LA=0:100) y no se observó crecimiento. Esto muestra que *I. fumosorosea* y *M. anisopliae* prefieren arroz como fuente de carbono principal, posiblemente se debe a la baja producción de enzimas lignocelulolíticas, requeridas para hidrolizar los componentes del lirio acuático o bagazo de caña de azúcar, en estos hongos.

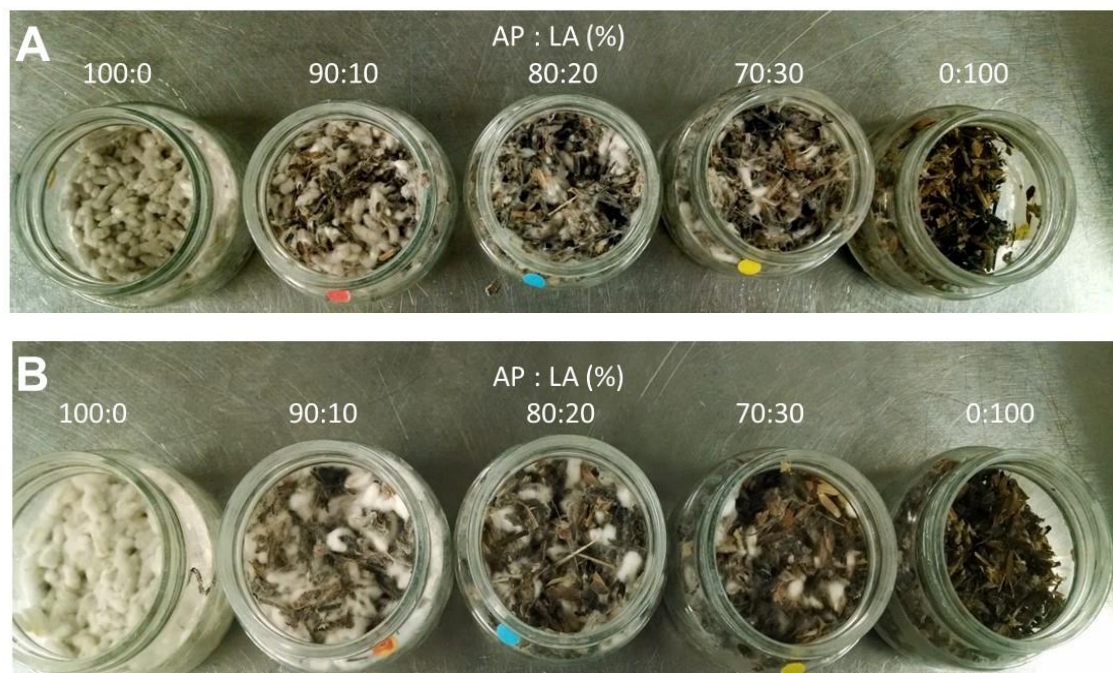


Figura 8.2.2.1. Fotografías de cultivos de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 (A) y ARSEF3302 (B) en el día 8, obtenidas en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático (LA).

Los resultados de las Gráficas 8.2.2.1, 8.2.1.1 y 8.2.2.2 apoyan que los valores extremos de porosidad ($\epsilon \approx 0.24$ y 0.48) son los menos favorables para la producción de conidios comparado con los valores intermedios ($\epsilon \approx 0.35 \pm 0.05$). En la

Tabla 8.2.2.1 se muestra un análisis estadístico de la producción de conidios en función de la porosidad y en tres experimentos independientes (experimentos realizados en diferentes días) y cada uno con tres réplicas (triplicado). Se debe notar que en el testigo (sin arroz, AP:LA= 0:100) no se observó crecimiento y en consecuencia no hubo conidiación, este efecto descarta el uso alternativo del lirio acuático como sustrato ($\epsilon \approx 0.48 \pm 0.01$), aunque si puede usarse como texturizante en los niveles establecidos en este estudio.

Tabla 8.2.2.1. Efecto de la porosidad en la producción de conidios de las cepas de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF3302.

Cepa	ϵ^* (adimensional)	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
		Ca^{**} Conidios $gasi^{-1}$ 1×10^9		Ca^{**} Conidios $gasi^{-1}$ 1×10^9		Ca^{**} Conidios $gasi^{-1}$ 1×10^9	
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	0.24	1.2 ±	0.04 ^c	1.53 ±	0.06 ^b	2.37 ±	0.43 ^b
	0.34	1.6 ±	0.11 ^a	2.5 ±	0.10 ^a	4.17 ±	0.10 ^a
	0.36	1.6 ±	0.11 ^{a,b}	2.47 ±	0.12 ^a	3.93 ±	0.27 ^a
	0.40	1.3 ±	0.11 ^{b,c}	1.37 ±	0.04 ^b	2.59 ±	0.14 ^b
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	0.24	4.7 ±	0.21 ^c	4.46 ±	0.37 ^b	1.97 ±	0.07 ^c
	0.34	5.8 ±	0.16 ^b	6.02 ±	0.15 ^a	4.08 ±	0.12 ^b
	0.36	7.3 ±	0.28 ^a	6.89 ±	0.75 ^a	5.07 ±	0.25 ^a
	0.40	4.7 ±	0.22 ^c	3.77 ±	0.13 ^b	2.1 ±	0.16 ^c

Tres replicas fueron analizadas en el día 8

* Porosidad

** Conidios por gramo de arroz seco inicial

^{c,d,e} Los valores promedio en la misma columna con diferente letra indica diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

La incorporación del lirio acuático fue efectivo para incrementar el valor de ϵ , hasta alcanzar un nivel crítico entre 0.34 y 0.36, por lo tanto se incrementa el área superficial y se mejora el intercambio gaseoso de acuerdo a **Arzumanov et al., 2005**; esto fue relacionado con la alta producción de conidios. Cuando los hongos crecen sobre sustrato sólido, la densidad de empaque (**Dorta y Arcas, 1998**) y la altura del lecho afectan la producción de conidios (**Kang et al., 2005**), así una alta

densidad de empaque puede limitar la aireación y por lo tanto el intercambio de gases en la parte inferior del lecho. Esta situación puede afectar adversamente el crecimiento del hongo (**Figuroa-Montero et al., 2011**).

Con la finalidad de explicar porque la porosidad tiene un valor óptimo para la producción de conidios, **Miranda et al., (2013)** y **Miranda et al., (2014)**, demostraron que la porosidad del poliuretano como soporte inerte tiene un efecto bifásico en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la inducción de superóxido dismutasa de *Aspergillus terreus*. Ésta es un área interesante de investigar porque señala la importancia de las propiedades estructurales del soporte sólido que van más allá de la composición de los substratos sólidos, y sobre los posibles efectos fisiológicos vinculados con la transferencia de oxígeno y la ocupación del espacio intersticial por el micelio, según lo sugerido por trabajos previos (**Auria et al., 1991**; **Volke-Sepúlveda et al., 2003**). Como una consecuencia práctica, los presentes resultados indican la necesidad de medir la porosidad como un parámetro de cultivo que cambia el rendimiento de conidios por gramo de substrato inicial. También existe la posibilidad de modificar este parámetro estructural por la mezcla adecuada de granos fáciles de metabolizar, con fibras que no se consumen. Es decir, granos de arroz mezclados con fibras de lirio acuático.

Al analizar si la extracción de conidios puede ser afectada por usar diferentes cantidades de Tween 80, un experimento simultáneo se llevó a cabo utilizando 80 mL de Tween 80 (solución al 0.05 %) para realizar la extracción de conidios de cada botella. Para la cepa CNRCB1 no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) en la extracción de conidios usando diferentes volúmenes de Tween 80 (solución al 0.05 %) o un mismo volumen (80 mL), para cada tratamiento con diferentes cantidades de texturizante (Tabla 8.2.2.2). Por otro lado, para la cepa ARSEF3302 se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) solamente en el tratamiento AP:LA=100:0. Sin embargo, los perfiles de mejorar la producción de conidios en las mezclas AP:LA=90:10 ($\epsilon=0.34$) y 80:20 ($\epsilon=0.36$) fueron siempre consistentes en ambas cepas (Tabla 8.2.2.3).

Tabla 8.2.2.2. Extracción de conidios producidos en el día 8 por *I. fumosorosea* CNRCB1.

Mezcla AP:LA (%)	Diferente volumen de Tween*			Igual volumen de Tween**		
	C_a^{***} (Conidios gasi ⁻¹) 1x10 ⁹			C_a^{***} (Conidios gasi ⁻¹) 1x10 ⁹		
100:0	1.17	±	0.12 ^c	1.04	±	0.03 ^c
90:10	1.93	±	0.25 ^a	1.93	±	0.13 ^a
80:20	1.76	±	0.15 ^{a,b}	1.76	±	0.19 ^a
70:30	1.48	±	0.10 ^{b,c}	1.4	±	0.10 ^b

* 60 mL de Tween 80 (solución al 0.05 %) fue utilizado para las mezclas 100:0 y 90:10, mientras que 70 y 80 mL se utilizaron en las mezclas 80:20 y 70:30, respectivamente.

** Extracción de conidios utilizando igual volumen (80 mL) de Tween 80 (solución al 0.05 %) en cada mezcla.

*** Conidios por gramo de arroz seco inicial.

^{a,b,c} Valores promedio en la misma columna con diferente letra indican diferencia significativa ($p>0.05$); no se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) cuando se realizó la comparación entre filas.

Tabla 8.2.2.3. Extracción de conidios producidos en el día 8 por *I. fumosorosea* ARSEF3302.

Mezcla AP:LA (%)	Diferente volumen de Tween*			Igual volumen de Tween**		
	C_a^{***} (Conidios gasi ⁻¹) 1x10 ⁹			C_a^{***} (Conidios gasi ⁻¹) 1x10 ⁹		
100:0	0.28	±	0.01 ^d	0.50	±	0.02 ^{*,c}
90:10	0.91	±	0.08 ^c	0.79	±	0.09 ^b
80:20	1.31	±	0.04 ^a	1.24	±	0.09 ^a
70:30	1.15	±	0.02 ^b	1.14	±	0.06 ^a

* 60 mL de Tween 80 (solución al 0.05 %) fue utilizado para las mezclas 100:0 y 90:10, mientras que 70 y 80 mL se utilizaron en las mezclas 80:20 y 70:30, respectivamente.

** Extracción de conidios utilizando igual volumen (80 mL) de Tween 80 (solución al 0.05 %) en cada mezcla.

*** Conidios por gramo de arroz seco inicial.

^{a,b,c,d} Valores promedio en la misma columna con diferente letra indican diferencia significativa ($p<0.05$).

* Significa que se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) cuando la comparación se realizó entre las filas.

8.2.3 Efecto de la porosidad sobre los parámetros de infectividad.

Para ambas cepas de *I. fumosorosea*, las pruebas de infectividad realizadas con *Galleria mellonella*, se hicieron con conidios obtenidos en el día 8, como ya se describió en los materiales y métodos. La Figura 8.2.3.1 muestra los estados típicos de infección de larvas de *G. mellonella* por *I. fumosorosea*. En los parámetros t_0 y TL_{50} no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos para la cepa CNRCB1 (Tabla 8.2.3.1). Esto indica que los conidios aéreos producidos en cada mezcla, inician su ciclo infectivo en un tiempo similar (entre 5.9 y 6.9 días), además matan el 50 % de la población entre 7.9 y 8.2 días; aunque los valores de S (nivel de sobrevivencia asintótica) difieren entre las muestras, los conidios obtenidos en las mezclas AP:LA= 100:0 y 90:10 alcanzaron la mayor mortalidad, se encontró diferencia significativa ($p<0.05$) entre los demás tratamientos. El hecho de que la cepa ARSEF3302 fue menos letal con larvas de *G. mellonella* ($S\leq 50\%$) comparado con la cepa CNRCB1, hace irrelevante la evaluación del TL_{50} . Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en los valores de t_0 . Por lo tanto, al incorporar el lirio acuático mezclado con arroz no hubo ningún efecto perjudicial sobre los parámetros de infectividad de ambas cepas de *I. fumosorosea*, cuando se evaluaron en larvas de *G. mellonella*, ya que el efecto principal fue en los niveles de conidiación.

El análisis de los parámetros de infectividad demostró que los conidios de la cepa CNRCB1 alcanzaron un valor de S entre 12 y 24 %, con un TL_{50} entre 7.9 y 8.6 días. Los valores fueron similares a los reportados recientemente por **Carrillo-Pérez et al. (2013)**, para conidios producidos en cultivo superficial de la cepa *Isaria fumosorosea* P43A, en bioensayos sobre larvas de *G. mellonella* (8.3 ± 1.45 días). Por otro lado, los conidios producidos por la cepa ARSEF3302 presentaron un valor promedio de $S \approx 55\%$, y el t_0 fue similar entre todas las mezclas de AP:LA ($t_0 \approx 6$ días), similar a los obtenidos por la cepa CNRCB1 ($t_0 \approx 6.5$ días); sin embargo, la cepa ARSEF3302 resultó ser menos infectiva que la cepa CNRCB1, esta

observación coincide con otro estudio reciente que muestra que la cepa ARSEF3302 fue menos infectiva contra larvas de *G. mellonella* comparado con la cepa CNRCB1 (Miranda-Hernández *et al.*, 2014). Además, las condiciones para una producción elevada de conidios no son necesariamente las óptimas para obtener conidios de alta calidad (Tarocco *et al.*, 2005; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

Tabla 8.2.3.1. Parámetros de infectividad de los conidios obtenidos de cultivos con distinta porosidad, de las cepas de *I. fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF3302 sobre larvas de *G. mellonella* como insecto hospedero.

Cepa	ε^*	t_0^{**} (días)	LT_{50}^{***} (días)	S^{****} (%)
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	0.24	6.92 ± 0.52 ^a	8.28 ± 0.47 ^a	12 ± 4.47 ^c
	0.34	6.67 ± 1.11 ^a	8.59 ± 0.48 ^a	14 ± 5.48 ^{b,c}
	0.36	6.46 ± 0.83 ^a	8.09 ± 0.69 ^a	22 ± 4.47 ^{a,b}
	0.40	5.92 ± 0.80 ^a	7.93 ± 0.23 ^a	24 ± 5.48 ^a
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	0.24	5.55 ± 0.64 ^a	NA [•]	42 ± 8.37 ^b
	0.34	6.53 ± 1.20 ^a	NA [•]	50 ± 10.0 ^{a,b}
	0.36	6.55 ± 0.69 ^a	NA [•]	56 ± 5.48 ^a
	0.40	5.10 ± 0.81 ^a	NA [•]	58 ± 4.47 ^a

* Porosidad.

** Tiempo de retardo, es el tiempo que tarda en aparecer la primera larva muerta.

*** Tiempo letal medio, cuando se alcanza el 50% de mortalidad.

**** Porcentaje de sobrevivencia.

^{a,b,c} los promedio en la misma columna con diferente letra indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

• No alcanzado.

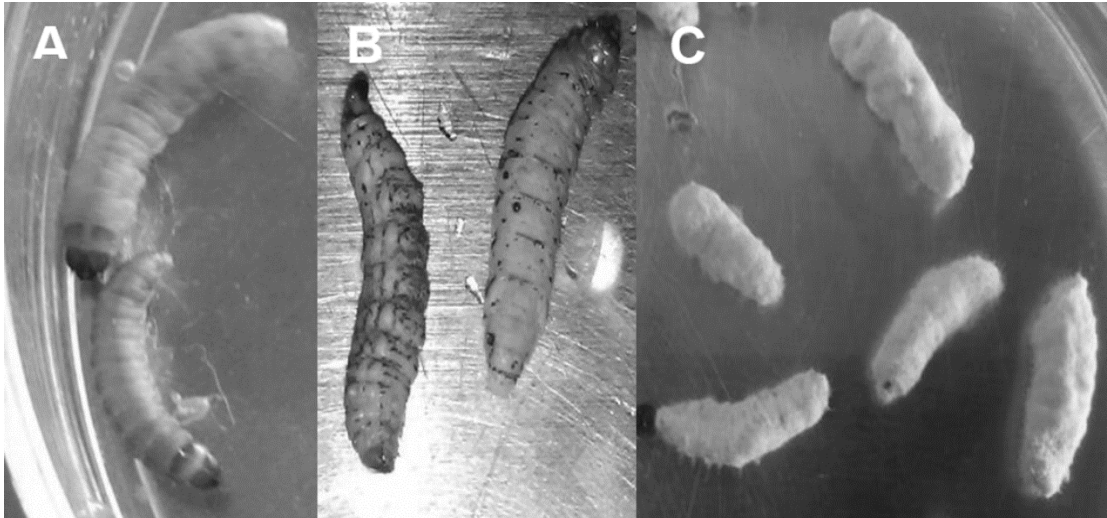


Figura 8.2.3.1. Estados típicos de infección de larvas *Galleria mellonella* por *Isaria fumosorosea* CNRCB1: a) larva no infectada; b) larva melanizada; c) larva con micosis. Los parámetros de infectividad son descritos en el texto

8.2.4 Efecto de la porosidad sobre la viabilidad y germinación

Se determinó la viabilidad y la germinación como parámetros de calidad de los conidios obtenidos en cada una de las mezclas de AP-LA. Para las tres cepas estudiadas, en la viabilidad no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$), siendo en promedio \approx del 90%, mientras que en la germinación no tuvo diferencia significativa ($p > 0.05$) en cada uno de los tratamientos, con un valor promedio \approx del 75%, los valores se presentan en la Tabla 8.2.4.1, Tabla 8.2.4.2 y Tabla 8.2.4.3, para las cepas *I. fumosorosea* CNRCB1, *I. fumosorosea* ARSEF3302 y *M. anisopliae* CP-OAX, respectivamente. Estos resultados demuestran que la incorporación del lirio acuático como agente texturizante no altera ambos parámetros, independientemente de la cepa estudiada y de la porosidad, lo cual resulta interesante, debido a que se recomienda un valor de viabilidad y germinación del 80% para la elaboración de un formulado (Alatorre-Rosas, 2006).

Tabla 8.2.4.1. Pruebas de calidad de conidios de *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 en CSS.

ϵ^*	Germinación		Viabilidad	
	%		%	
0.24	90.62	± 1.47 ^A	76.67	± 2.52 ^A
0.34	90.06	± 1.83 ^A	78.33	± 3.93 ^A
0.36	90.16	± 3.22 ^A	74.33	± 4.18 ^A
0.40	90.65	± 0.88 ^A	76.67	± 1.86 ^A

* Porosidad.

^A Medias en la misma columna con letras distintas indican diferencia significativa entre las medias ($p < 0.05$).

Tabla 8.2.4.2. Pruebas de calidad de conidios de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 en CSS.

ϵ^*	Germinación		Viabilidad	
	%		%	
0.24	91.12	± 1.06 ^A	74.67	± 1.53 ^A
0.34	91.66	± 0.95 ^A	77.89	± 2.41 ^A
0.36	92.51	± 0.69 ^A	77.33	± 3.38 ^A
0.40	90.87	± 0.87 ^A	75.22	± 4.22 ^A

* Porosidad.

^A Medias en la misma columna con letras distintas indican diferencia significativa entre las medias ($p < 0.05$).

Tabla 8.2.4.3. Pruebas de calidad de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX en CSS.

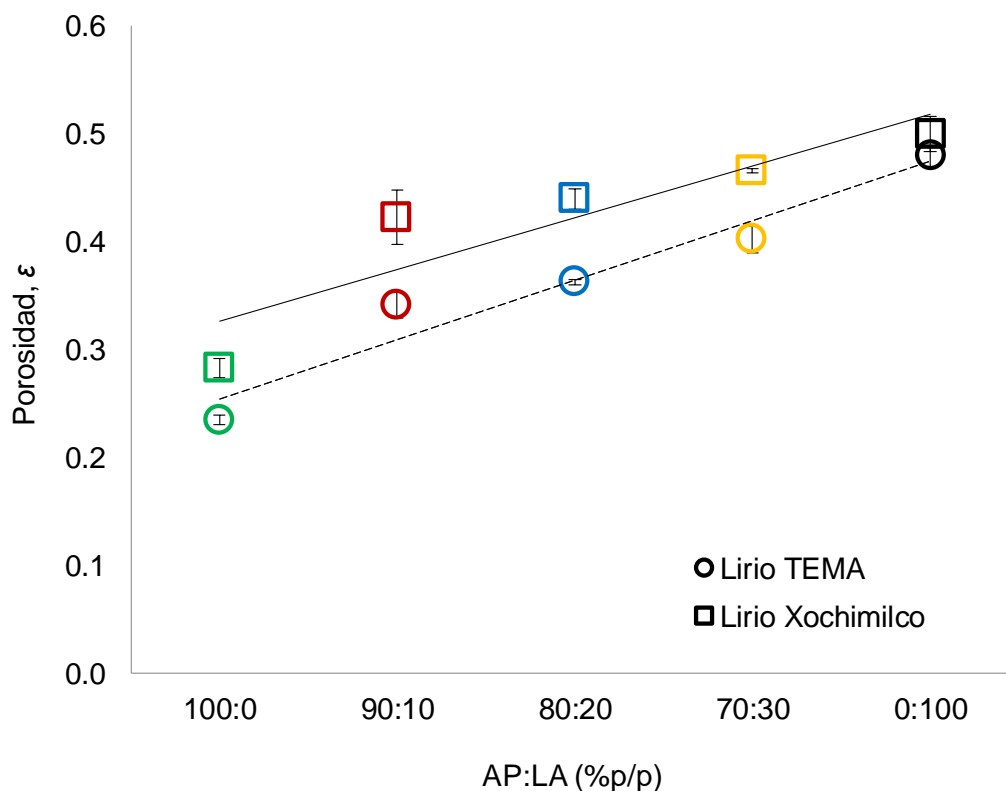
ϵ^*	Germinación		Viabilidad	
	%		%	
0.24	90.23	± 2.00 ^A	76.67	± 1.20 ^A
0.34	90.23	± 1.97 ^A	74.67	± 4.16 ^A
0.36	91.95	± 2.69 ^A	76.11	± 3.34 ^A
0.40	90.68	± 2.24 ^A	74.22	± 2.87 ^A

* Porosidad.

^A Medias en la misma columna con letras distintas indican diferencia significativa entre las medias ($p < 0.05$).

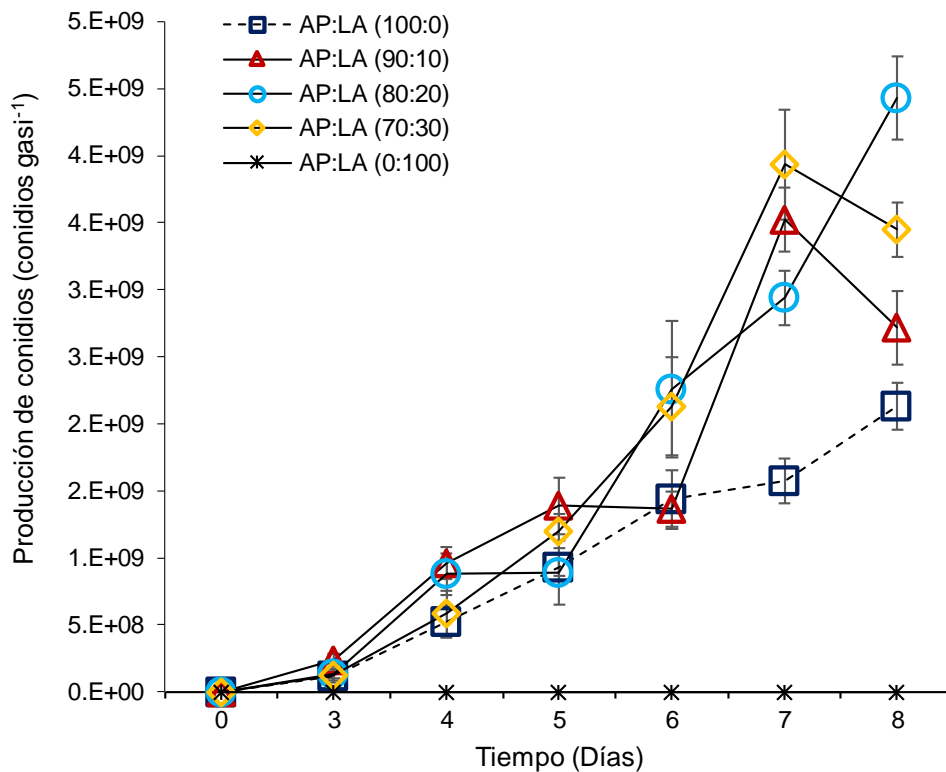
8.2.5 Producción de conidios con lirio acuático de Xochimilco

Con la finalidad de buscar diferencias entre dos lotes de lirio acuático, se usó un lote obtenido de la empresa TEMA (Sección 7.2) y otro obtenido de Xochimilco y proporcionado en la Planta de Fermentación en Medio Sólido (PP4, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa). Se utilizó lirio acuático de Xochimilco en una mezcla de tallo con hojas con una proporción 1:1, se incorporó mezclándolo con arroz precocido, en las condiciones y tratamientos como se describió en la sección 7.2. Se encontró que la porosidad fue más alta con el lirio de Xochimilco (Gráfica 8.2.5.1), comparado con la obtenida en el lirio de TEMA, la porosidad incrementó significativamente ($p < 0.05$), con una correlación lineal cuya ecuación y coeficiente de correlación fueron: $Y = 0.0478 \cdot X + 0.2789$; $R^2 = 0.823$, respectivamente. En la ecuación lineal, la variable independiente (X) indica la proporción (% peso/peso) de arroz-texturizante y la variable dependiente (Y) representa la porosidad (ϵ).



Gráfica 8.2.5.1. Porosidad en mezclas de arroz precocido con lirio acuático obtenido de dos lotes diferentes. La correlación lineal se indica como línea punteada.

Utilizando el lirio acuático Xochimilco, se realizaron cinéticas de producción de conidios para las cepas de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF3302, los resultados se muestran en las Gráficas 8.2.5.2 y 8.2.5.3, respectivamente. Para la cepa CNRCB1 los niveles de producción obtenidos a los 8 días de cultivo fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$), con un incremento de ≈ 2 veces entre las mezclas 80:20 y 100:0. De forma similar, para la cepa ARSEF3302 se alcanzaron altos niveles de producción en 6 días, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) en las mezclas 80:20 y 70:30 con una producción $\approx 4 \times 10^9$ conidios gasi^{-1} , sin embargo, fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$) comparado con la mezcla 100:0, con un incremento de ≈ 4 veces. Sin embargo, al utilizar el lirio acuático de Xochimilco en ambas cepas se encontró una respuesta distinta en los niveles de conidiación en comparación con los resultados obtenidos al utilizar el lirio de TEMA como texturizante.



Gráfica 8.2.5.2. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa *Isaria fumosorosea* CNRCB1 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático de Xochimilco (LAX).

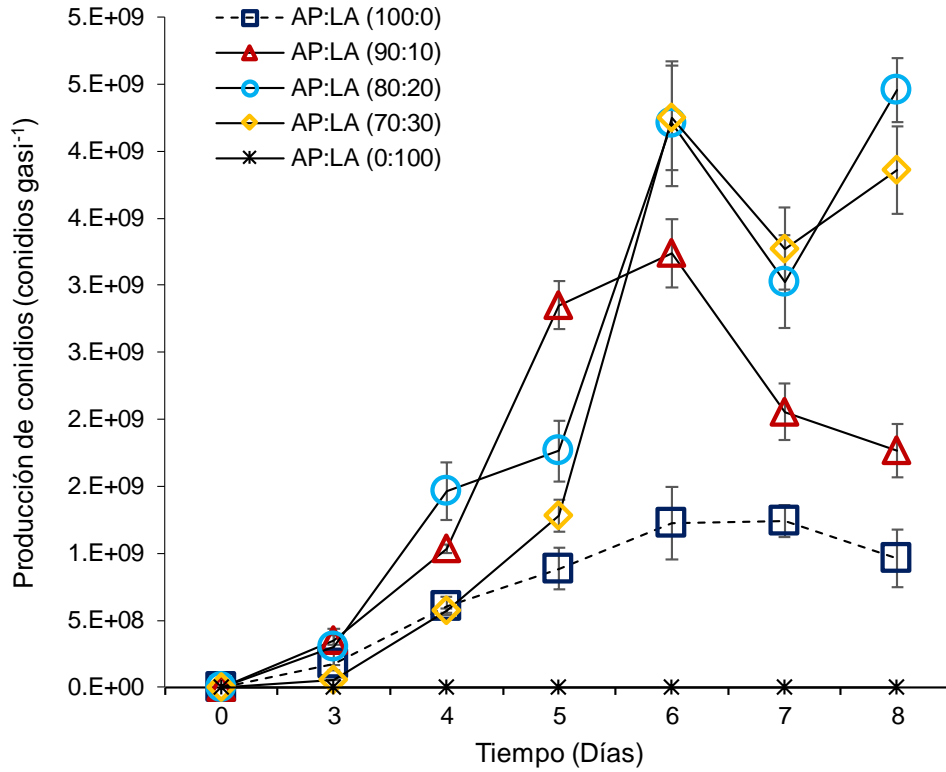
Con relación a la composición de compuestos lignocelulósicos del lirio, esta depende de la fracción que se analiza (tallo, hoja o lirio sin raíz); sin embargo, en general se ha reportado un alto contenido de cenizas (de 11 a 22% bs) y de lignina (8 a 18%). El contenido de material lignocelulósico es mayor en hojas que en tallos (Tabla 8.2.5.1). Sin embargo, el contenido de hemicelulosa en los tallos es mayor (Juárez-Luna, 2011).

Tabla 8.2.5.1. Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA.

Sección	Lote	Hemicelulosa %	Celulosa %	Lignina %
tallo + hoja	TEMA	28.15	8.63	14.67
tallo	Xochimilco	28.94	15.81	9.35
hoja	Xochimilco	22.11	23.72	17.27

Tomado de Juárez-Luna, (2011).

Con base en los datos reportados por Juárez-Luna, (2011), se construyó la Tabla 8.2.5.2, en donde se observa que la composición de lignina, hemicelulosa y celulosa en el lote de lirio TEMA, se asemeja con la composición del lirio Xochimilco, esto significa, que el lote TEMA puede ser una mezcla de un lirio de aproximadamente 11 meses de edad (Juárez-Luna, 2011), cuya composición no puede asociarse al efecto positivo que tuvo en el tratamiento AP:LA 70-30 sobre la producción de conidios en las cepas de *Isaria fumosorosea*, ese efecto puede estar relacionado con la porosidad generada con la mezcla de lirio Xochimilco (50% tallo y 50% hoja) que es superior en comparación con el lirio TEMA (Gráfica 8.4.1).



Gráfica 8.2.5.3. Cinéticas de producción de conidios durante 8 días para la cepa *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 en mezclas de arroz precocido (AP) y lirio acuático de Xochimilco (LAX).

Tabla 8.2.5.2. Composición promedio de las fracciones tallo y hoja y lirio TEMA.

Lote de lirio	Mezcla AP:LA	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina
	% p/p	g	g	g
TEMA	100-0	0	0	0
	90-10	0.282	0.086	0.147
	80-20	0.563	0.173	0.293
	70-30	0.845	0.259	0.440
XOCHIMILCO	100-0	0	0	0
	90-10	0.255	0.198	0.133
	80-20	0.511	0.395	0.266
	70-30	0.766	0.593	0.399

8.3 ETAPA TRES

En este capítulo se determinó el efecto de la porosidad sobre las tasas de respiración máxima (R_{max}) y la asociada al mantenimiento (R_e), a su vez, se realizó una correlación de estos parámetros cinéticos con la producción de conidios.

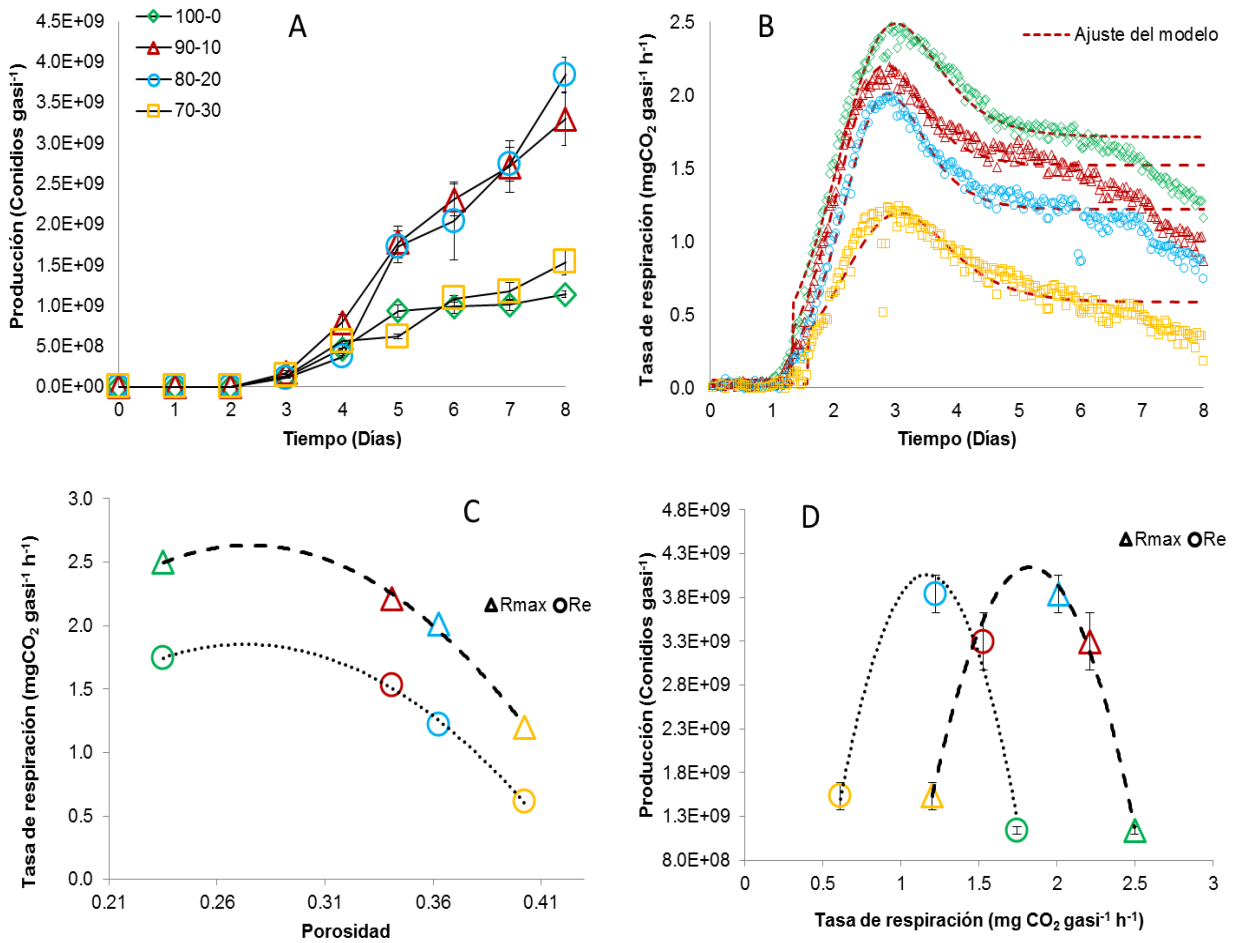
8.3.1 Correlación entre las tasas de respiración máxima y asociada a mantenimiento sobre la producción de conidios

Los análisis de respirometría para las cepas de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y ARSEF3302 se muestran en las Gráficas 8.3.1 y 8.3.2, respectivamente. Para la cepa CNRCB1 a los 8 días de cultivo se alcanzó la mayor producción de conidios en todas las mezclas de AP:LA (Gráfica 8.3.1 A), en los tratamientos con 10 y 20 % de LA se obtuvo el mayor rendimiento con un incremento de ≈ 2.8 y 3.4 veces, respectivamente. Para todas las mezclas de AP:LA, la tasa máxima de respiración ($R_{m\acute{a}x}$) se alcanzó a los 3 días de cultivo que es el tiempo en que inicia la producción de conidios, es decir, el índice de conidiación es superior al inóculo inicial (Gráfica 8.3.1 B). Además, se encontró que hay un intervalo de porosidad $\epsilon \approx$ entre 0.26 y 0.31, en donde la tasa de respiración asociada al mantenimiento (R_e) y $R_{m\acute{a}x}$ son máximas (Gráfica 8.3.1 C), aunque no es proporcional al nivel de conidiación alcanzado en cada valor de porosidad. Del mismo modo, es evidente observar que a un valor de $R_e \approx 1.2 \text{ mgCO}_2 \text{ gasi}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $R_{m\acute{a}x} \approx 1.8 \text{ mgCO}_2 \text{ gasi}^{-1} \text{ h}^{-1}$, la producción de conidios es máxima (Gráfica 8.3.1 D).

Para la cepa ARSEF a los 8 días de cultivo se alcanzó la mayor producción de conidios en todas las mezclas de AP:LA (Gráfica 8.3.2 A), en los tratamientos con 10 y 20 % de LA se obtuvo el mayor rendimiento con un incremento de ≈ 1.2 y 1.4 veces, respectivamente. La tasa máxima de respiración ($R_{m\acute{a}x}$) se alcanzó a los 3 días de cultivo para las mezclas 90:10, 80:20 y 70:30, mientras que en el tratamiento 100:0 fue \approx a los 2 días de cultivo, tiempo que puede estar asociado al inicio de la producción de conidios (Gráfica 8.3.2 B). Además, se encontró que hay un valor de porosidad $\epsilon \approx 0.3$, en donde la tasa de respiración asociada al

mantenimiento (Re) y $R_{m\acute{a}x}$ son máximas (Gráfica 8.3.2 C). De forma similar, se observó que a un valor de $Re \approx 1.5 \text{ mgCO}_2 \text{ gasi}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $R_{m\acute{a}x} > 2.5 \text{ mgCO}_2 \text{ gasi}^{-1} \text{ h}^{-1}$, la producción de conidios es máxima (Gráfica 8.3.2 D).

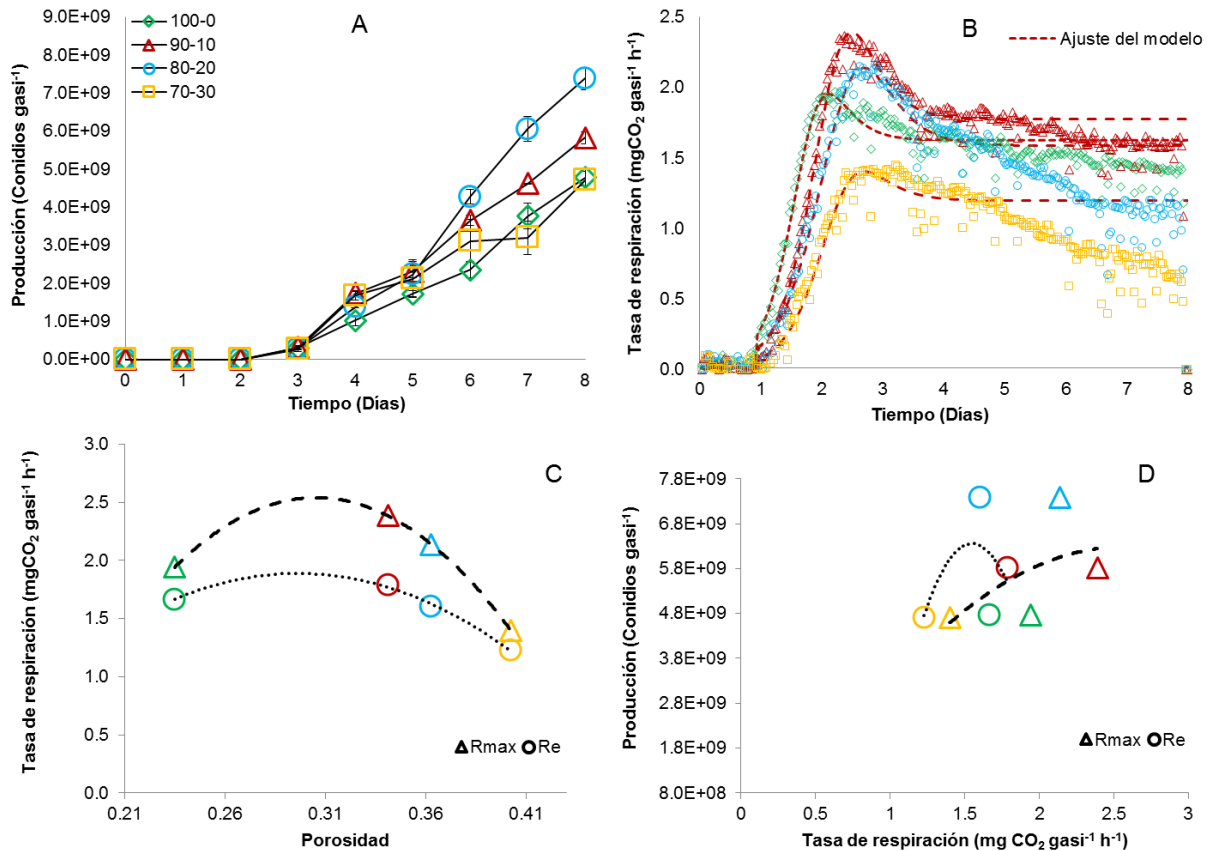
Se ha demostrado en trabajos realizados en cultivo sobre soporte sólido, que un ambiente con altas concentraciones de CO_2 disminuye la producción de esporas en hongos filamentosos y favorece la síntesis de metabolitos secundarios como el ácido cítrico (**Prado et al., 2004; Zitova et al., 2010**). Un ambiente bajo en oxígeno está directamente relacionado con el crecimiento limitado del microorganismo. En reactores de charolas se ha observado que espesores de lecho altos, la compactación del sustrato es mayor comparado al utilizar espesores pequeños (**Prado et al., 2004**). Esto puede explicar el hecho que la acumulación de CO_2 incrementa en lechos con sustratos más compactos o con mayor espesor de lecho que dificulta el recambio gaseoso. Esto último sucede en el tratamiento AP:LA= 100:0, en donde la porosidad es baja ($\epsilon \approx 0.24$) debido a la compactación de los granos de arroz, y en consecuencia, la producción de conidios se ve disminuida. Asimismo, un espesor alto de lecho de empaque genera una limitación en la transferencia de gases, como sucedió en el tratamiento AP:LA (70:30).



Gráfica 8.3.1. Producción de conidios (A), tasa de respiración (B), correlación entre ϵ y R (C), y correlación entre R y C (D), de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 sobre mezclas de AP:LA (% p/p).

Los perfiles de tasa de producción de CO_2 disminuyen gradualmente después de alcanzar el máximo, aproximadamente a partir del tercer día y en consecuencia inicia la producción de conidios para las cepas de *Isaria fumosorosea*. Se ha reportado que la producción de conidios inicia cuando la glucosa en el medio comienza a agotarse (Lareo *et al.*, 2006). En este tiempo el perfil de la producción de CO_2 acumulado se vuelve más plano, correspondiente al inicio de la fase estacionaria. Con ello la producción de CO_2 puede estar asociada con el crecimiento y mantenimiento del microorganismo, la desaceleración gradual observada en la tasa de producción de CO_2 puede deberse a la respiración endógena y a la formación de conidios. Por el hecho de que, no solo se forma micelio durante el crecimiento, sino que también se producen conidios (Pintado *et al.*, 1998; Lareo *et*

al., 2006). La estimación de los parámetros cinéticos, fueron obtenidos de los perfiles de producción de CO₂, aunque, los ajustes hechos para calcular las tasas de respiración no predicen parte de la fase de decaimiento, tales parámetros pueden ser usados en modelos para el diseño y control de un cultivo sobre soporte sólido (Lareo *et al.*, 2006).



Gráfica 8.3.2. Producción de conidios (A), tasa de respiración (B), correlación entre ϵ y R (C), y correlación entre R y C (D), de *Isaria fumosorosea* ARSEF sobre mezclas de AP:LA (% p/p).

9 CONCLUSIONES

- Los resultados demuestran que los HE estudiados requieren de aireación natural para el proceso de conidiación, (el cual se ve afectado al incrementar el flujo de aire durante su crecimiento) un incremento en el flujo de aire repercute negativamente en los niveles de conidiación.
- Se comprobó que el lirio acuático puede ser utilizado como un texturizante en CSS, ya que modifica la porosidad del lecho, evita la compactación del sustrato, además de que no es utilizado como nutriente por los HE estudiados.
- La porosidad es un parámetro que debe considerarse en CSS, ya que a partir de este es posible incrementar la producción de conidios de los HE estudiados, considerando que existen valores óptimos para ello.
- Respecto a la calidad de los conidios, esta no se vio afectada por los rangos de porosidad estudiados, lo cual es un factor a considerar en la producción a gran escala de estos propágulos.
- La porosidad es una variable que debe ser considerada en la optimización de la producción de los HE en CSS ya que modifica tanto la tasa de respiración máxima (R_{max}) como la asociada a mantenimiento (R_e).
- Es importante considerar la estructura del lirio acuático en su uso como texturizante ya que, de acuerdo a esta, se modifica la porosidad del lecho, lo que impacta directamente en la producción de los propágulos.

10 PERSPECTIVAS

- Estudio para determinar la concentración de metales pesados en los lotes del lirio acuático utilizado y determinar así un posible efecto en la conidiación de los HE estudiados.
- Comprobar que el rango de porosidad que fue favorable en la producción de propágulos en este estudio, puede tener un efecto positivo al usar diferentes residuos agroindustriales como texturizantes.
- Establecer los valores de humedad y actividad de agua en el sistema de producción estudiado en esta investigación.
- Determinación de especies reactivas de oxígeno y su relación con la producción de conidios de HE en CSS, utilizando arroz como sustrato y lirio acuático como texturizante.

11 REFERENCIAS

- Arcas J.A., Díaz B.M. y Lecuona R.E. (1999). Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology*. 67:151-158.
- Arzumanov T., Jenkins N. y Roussos S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 40:1037-1042.
- Auria R., Palacios J. y Revah, S. (1991). Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 39:898-902.
- Barranco-Flrido J.E., Alatorre-Rosas R., Gutiérrez-Rojas M., Viniestra-González G. y Saucedo-Castañeda G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:910-915.
- Bellon-Maurel V., Orliac O. y Christen P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*. 38:881-896.
- Bidochka M.J. y Khachatourians G.G. (1991). The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58:106-117.
- Borman A.M., Szekely A., Campbell C.K. y Johnson E.M. (2006). Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in steril water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. 161:362-368.
- Braga G.U.L, Destéfano R.H.R. y Messias C.L. (1999). Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74:112-119.
- Brinkman M.A. y Gardner W. A. (2000). Enhanced activity of *Beauveria bassiana* to red imported fire ant workers (Hymenoptera: Formicidae) infected with *Thelohania solenopsae*. *Journal of Agricultural and Urban Entomology*. 17(4):191-195.
- Bustillo A. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá, pp. 30-53.
- Carrillo-Pérez E., Acosta-Smith E., Montesinos-Cisneros R.M. y de la Torre M. (2013). Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propágulos. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29:309-317.
- Charnley A.K. (1992). Mechanism of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. En: Lomer, C.J., C. Prior (eds.), Biological control of locusts and grasshoppers. Melkshan, UK: CAB International. pp. 191-190.
- Charnley A.K. y Collins S.A. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: Kubicek, C.P., I.S. Druzhinina (eds.), Environmental and Microbial Relationship. The Mycota IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 159-187.

- Cliquiet S. y Jackson M.A. (1999). Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. *Journal of Industrial and Biotechnology*. 23:97-102.
- Cruz-Córdova T., Roldan-Carrillo T.G., Díaz-Cervantes D., Ortega-López J., Saucedo-Castañeda G., Tomasini-Campocoso A. y Rodríguez-Vázquez. (1999). CO₂ evolution and ligninolytic and proteolytic activities of *Phanerochaete chysosporium* grown in solid state fermentation. *Resources Conservation and Recycling*. 27:3-7.
- Dalla Santa H.S., Sousa N.J., Brand D., Dalla Santa O.R., Pandey A., Sobotka M., Páca J. y Soccol C. R. (2004). *Conidia* production of *Beauveria bassiana* sp. by Solis-State Fermentation for Biocontrol of *Ilex paraguariensis* Caterpillars. *Folia Microbiologica*. 49(4):418-422.
- De Faria M. y Wraight S. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43:237-256.
- Deshpande M. (1999). Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*. 25:229-243.
- Dorta B. y Arcas J. (1998). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:501-505.
- Dorta B., Bosch A., Arcas J.A. y Ertola R.J. (1990). High level of sporulation of *Metarhizium anisopliae* in a medium containing by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33:712-715.
- Eken C., Tozlu G., Dane E., Coruh S. y Demiri E. (2006). Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina:Hypomycetes) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia*. 162:69-71.
- Fan Y., Fang W., Guo S., Pei X., Zhang Y., Xiao Y., Li D., Jin K., Bidochka M. J. y Pei Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:295-302.
- Fang W., Pava-Ripoll M., Wang S. y St Leger R. (2009). Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 46:277-285.
- Fargues J., Smits N., Vidal C., Vey A., Veja F., Mercadier G. y Quimby P. (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 154(3):127-138
- Fernández-Rosas F. (2006). Métodos de preservación. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
- Figuroa-Montero A., Esparza-Isunza T., Saucedo-Castañeda G., Huerta-Ochoa S., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 86:1321-1331.

- Freimoser F.M., Grundschober A., Tuor U. y Aebi M. (2003). Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. *FEMS Microbiology Letters*. 222:281-287.
- Gao L. y Liu X. (2010). Nutritional requirements of mycelial growth and sporulation of several biocontrol fungi in submerged and on solid culture. *Microbiology*. 79(5):612-619.
- Glare T. R. (2004). In Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications: Biotechnological potential of entomopathogenic fungi (Arora, D. K., ed.), CRC Press, Marcel Dekker Inc, New York, pp. 79-90.
- Goettel M.S. y Roberts D.W. (1992). Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. En: Biological Control of Locust and Grasshoppers (Proceedings of a Workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, 29April - 1May 1991), Lomer C. J. y Prior C. (Eds.), C A B International, Section IV: 230 - 238.
- Griffin D.H. (1981). Fungal physiology. A while-Interscience publication, USA. New York. pp. 102-127, 260-279.
- Hajek A.E. y St. Leger R.J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39:293-322.
- Hegedus D.D., Bidochka M.J. y Khachatourians G.G. (1990). *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33:641-647.
- Hegedus D.D., Bidochka M.J., Miranpuri G.S. y Khachatourians G.G. (1992). A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36:785-789.
- Ibrahim L., Butt T.M. y Jenkinson P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106:705-715.
- Jackson M.A. y Payne A.R. (2007). Evaluation of the desiccation tolerance of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) using a lab-scale, air-drying chamber with controlled relative humidity. *Biocontrol Science and Technology*. 17(7):709-719.
- Jackson M.A., Dunlap C.A. y Jaronski S.T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*. 55:129-145.
- Jaronski S.T. y Jackson M.A. (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In Lacey, L. A. (Ed.), Manual of techniques in invertebrate pathology (pp. 255-28). Academic Press: San Diego.
- Jefferies L.B. y Khachatourians G.G. (1997). Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:23-28.

- Jenkins N.E., Heviefo G., Langewald J., Cherry A.J. y Lomer C.J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19:21-31.
- Juarez-Luna G.N. (2011). Cambios en la composición del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) debidos a su grado de madurez y a su transformación biotecnológica. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Kang S., Lee S., Yoon C. y Kim S. (2005). Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 27:135-139.
- Khachatourians G.G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En *The Mycota VI . Human and Animal Relationships*, Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. Pp 331-364.
- Kim J.J., Xie L., Hee-Han J. y Yeob Lee S. (2014). Influence of additives on the yield and pathogenicity of conidia produced by solid state cultivation of an *Isaria javanica* isolate. *Mycobiology*. 42(4):346-352.
- Kim J.S., Je Y.H. y Roh J. Y. (2010). Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37:419-423.
- Krishna C. (2005). Solid-State Fermentation Systems-An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25:1-30.
- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H.K. y Vail P. (2001). Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biological Control*. 21:230-248.
- Lareo C., Sposito A.F., Bossio A.L. y Volpe D.C. (2006). Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:391-399.
- Le-Tian S., Zheng-Liang W., Sheng-Hua Y. y Ming-Guang F. (2010). Hydrophobicity-related protein contents and surface areas of aerial conidia are useful traits for formulation design of fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*. 169:483-494.
- López-Lastra C.C., Hajek A.E. y Humber R.A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.
- Malik A. (2007). Environmental challenge *vis a vis* opportunity: The case of water hyacinth. *Environment International*. 33:122-138.
- Marmaras V.J., Charalambidis N.D. y Zervas C.G. (1996). Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 31:119-133.
- Miranda R.U., Gómez-Quiroz L.E., Mejía A. y Barrios-González J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: differences and similarities in submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*. 117:85-93.
- Miranda R.U., Gómez-Quiroz L.E., Mendoza M., Pérez-Sanchez A., Fierro F. y Barrios-González J. (2013). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*. 118:979-989.

- Miranda-Hernández F., Saucedo-Castañeda G., Alatorre-Rosas R. y Loera O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*. 70:661-666.
- Mitchell D.A., Meien O.F., Luz Jr L.F.L. y Berovič M. (2006). En Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation: Substrate, air, and thermodynamic parameters for SSF bioreactor models (Mitchell, D. A., Berovič, M., & Krieger, N., eds.), Springer, Springer-Verlag, Berlin, pp. 265-278.
- Montesinos-Matías R., Viniegra-González G., Alatorre-Rosas R. y Loera O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27:2095-2102.
- Monzón A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas. (CATIE, Costa Rica) 63:95-103.
- Moura-Mascarin G., Alves S.B. y Lopes R.B. (2010). Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53:753-761.
- Moura-Mascarin G., Naomi-Kobori N., Dias-Quintela E. y Delalibeta Jr I. (2013). The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*. 66:209-218.
- Núñez-Gaona O., Saucedo-Castañeda G., Alatorre-Rosas R. y Loera O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53:771-777.
- Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13:81-84.
- Pedrini N., Crespo R. y Juárez M.P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146:124-137.
- Pérez L. y Ramírez C. (2000). Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción de *Trichoderma harzianum*. Bogotá. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial.
- Pintado J., Lonsane B.K., Gaime-Perraud I. y Roussos S. (1998). On-line monitoring of citric acid production in solid-state culture by respirometry. *Process Biochemistry*. 33(5):513-518.
- Pliego-Sandoval J., Amaya-Delgado L., Mateos-Díaz J.C., Rodríguez J., Córdova, J. y Alba A. (2012). Multiplex gas sampler for monitoring respirometry in column-type bioreactors used in solid-state fermentation. *Biotechnology and Biotechnology*. 26(3):3031-30-38.

- Prado F.C., Vandenberghe L.P.S., Lisboa C., Paca J., Pandey A. y Soccol R. (2004). Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. *Engineering in Life Sciences*. 4(2):179-186.
- Pucheta Díaz M., Flores Macías A., Rodríguez Navarro S. y de la Torre M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*. 31:856-860.
- Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., Paul le Comte E., Tramper J. y Rinzema A. (2002). Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*. 78 (5):539-544.
- Raimbault M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3):174-188.
- Rodríguez-Gómez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G. y Viniegra-González G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:513-518.
- Samuels K.D.Z., Heale J.B. y Liwellyn M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvate lugen*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53:25-31.
- Sánchez-Arias V., Fernández F.J., Rodríguez L. y Villaseñor J. (2012). Respiration indices and stability measurements of compost through electrolytic respirometry. *Journal of Environmental Management*. 95:5134-5138.
- Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Dufour D. y Raimbault M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*. 29:13-24.
- Shi Y., Xu X. y Zhu Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82:921-927.
- Spardo D. y Gullino M.L. (2004). State of the art future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91:185-194.
- St. Leger R.J., Joshi L., Bidochka M. y Roberts D.W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide over expressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy Sciences USA*. 93:6349-6354.
- Tanada Y. y Kaya H.K. (1993). Insect pathology. Academic Press. San Diego, California (USA). Pp. 171-206.
- Tarocco F., Lecuona R.E., Couto A.S. y Arcas J.A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68:481-488.
- Taylor B., Edgington S., Luke B. y Moore D. (2013). Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *Journal of Store Products Research*. 53:23-26.
- Tlecuitl-Beristain S., Viniegra-Gonzalez G., Díaz-Godínez G. y Loera O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on

- Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. 169:387-394.
- Van Breukelen F.R., Haemers S., Wijffels R.H. y Rinzema A. (2011). Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochemistry*. 46:751-757.
- Vega F.E., Meyling N.V., Luansay-hard J.J. y Blackwell M. (2012). En F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect pathology: Fungal entomopathogenic* (pp. 171–206). San Diego: Academic Press.
- Villamagna A. y Murphy B. (2010). Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review. *Freshwater Biology*. 55:282-298
- Vinson S.B. (1991). Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera. En: Pathak, J.P.N. (Ed.), *Insect Immunity*. Dordrecht, Boston and London: Kluwer Academic Publishers. pp. 171-187.
- Volke-Sepúlveda T.L., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresorce Technology*. 87:81–86.
- Wang C. y St. Leger R.J. (2007). The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*. 6:808-816.
- Ye S., Ying S., Chen C. y Feng M. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*. 28:799-804.
- Ying S.H. y Feng M.G. (2004). Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*. 97:323-331.
- Zimmermann G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*. 17(9):879-920.
- Zimmermann G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 18:865-901.
- Zitova A., Hynes J., Kollar J., Borisov S.M., Klimant I. y Papkovsky D.B. (2010). Analysis of activity and inhibition of oxygen-dependent enzymes by optical respirometry on the lightcycler system. *Analytical Biochemistry*. 397:144-151.

12 Anexo

En este capítulo se presenta una lista de la productividad obtenida del trabajo realizado durante la Maestría y Doctorado, hubo participación en congresos tanto en la modalidad de cartel, como oral, así como la aceptación de un artículo en una revista JCR con factor de impacto de 1.735.

Artículo en revista indexada

- ✚ Angel-Cuapio Alejandro, Figueroa-Montero Arturo, Favela-Torres Ernesto, Viniegra-González Gustavo, Perraud-Gaime Isabelle, Loera Octavio. (2015). Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: Effect on conidial yields and quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 446-457.

Congresos

- ✚ Participación en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, presentando el trabajo libre en modalidad de CARTEL “Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante”. **Junio 2011.**
- ✚ Participación en el II Simposio La situación de los plaguicidas en México: impactos y perspectivas, presentando el trabajo libre en modalidad de CARTEL “Producción de conidios de hongos entomopatógenos en cultivo en soporte sólido”. **Octubre 2011.**
- ✚ Participación en el XXXV Congreso Nacional de Control Biológico y XXII Curso Nacional de Control Biológico, presentando el trabajo libre en modalidad ORAL “Producción de conidios de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 sobre arroz y lirio acuático como texturizante”. **Noviembre 2012.**

- ✚ Participación en el XXXV Congreso Nacional de Control Biológico y XXII Curso Nacional de Control Biológico, presentando el trabajo en modalidad de CARTEL “Efecto de la aireación en cultivo sobre sustratos sólidos para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX”. **Noviembre 2012.**
- ✚ Participación XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, presentando el trabajo en su modalidad de CARTEL “Water hyacinth as a suitable texturizer in solid cultures for the production of conidia of *Isaria fumosorosea*”. **Junio 2013.**
- ✚ Participación en el XXXVI Congreso Nacional de Control Biológico, presentando el trabajo en modalidad ORAL “Producción e infectividad de conidios de *Isaria fumosorosea* obtenidos por cultivo en soporte sólido con lirio acuático como texturizante”. **Noviembre 2013.**
- ✚ Participación en el 4th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering, presentando el trabajo en modalidad ORAL “Análisis de respirometría en la producción de conidios de *Isaria fumosorosea* en cultivo en soporte sólido”. **Septiembre 2014.**
- ✚ Participación en el XXXVII Congreso Nacional de Control Biológico, presentando el trabajo en modalidad de CARTEL “Efecto de la porosidad de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivo en soporte sólido”. **Septiembre 2014.**
- ✚ Participación en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, presentando el trabajo libre en modalidad de CARTEL “La porosidad determina los perfiles de respiración y conidiación de *Isaria fumosorosea* CNRCB1 en cultivo sólido”. **Junio 2015.**



Critical Values of Porosity in Rice Cultures of *Isaria fumosorosea* by Adding Water Hyacinth: Effect on Conidial Yields and Quality

Alejandro Angel-Cuapio¹ • Arturo Figueroa-Montero² •
Ernesto Favela-Torres¹ • Gustavo Viniegra-González¹ •
Isabelle Perraud-Gaime³ • Octavio Loera¹

Received: 21 May 2015 / Accepted: 6 July 2015 /

Published online: 17 July 2015

© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Conidia of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* are used to control insect pests in crops. Commercially available mycoinsecticides manufactured with this fungus are produced on a large scale via solid-state cultures (SSC). In order to favour gaseous exchange in SSC, texturizers can be added to increase porosity fraction (ϵ). This work presents results of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) as a novel texturizer. A mixture of parboiled rice (PR), with a $\epsilon=0.23$, was used as a substrate, which was then mixed with water hyacinth (WH amendment) as a texturizer at different proportions affecting ϵ . Strains CNRCB1 and ARSEF3302 of *I. fumosorosea* yielded $1.6 (1.49-1.71) \times 10^9$ and $7.3 (7.02-7.58) \times 10^9$ conidia per gram of initial dry rice after 8 days, at ϵ values of 0.34 and 0.36, respectively. Improvement of conidial yields corresponded to 1.33 and 1.55 times, respectively, compared to rice alone using WH amendment in the mixtures PR:WH (%) at 90–10 and 80–20. In addition, infectivity against *Galleria mellonella* larvae was maintained. This is the first report of the use of water hyacinth as a texturizer in SSC, affecting ϵ , which is proposed a key parameter in conidia production by *I. fumosorosea*, without affecting conidial infectivity.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12010-015-1754-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Octavio Loera
loera@xanum.uam.mx

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, CP 09340, Iztapalapa, Mexico, DF, Mexico

² Departamento de Procesos y Tecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, CP 05348, Cuajimalpa, Mexico, DF, Mexico

³ Equipe_Eco technologies et Bioremédiation, Aix Marseille Université, IMBE-UMR CNRS-7263/IRD-237, Case 421, Campus Etoile, Faculté St Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

Keywords *Isaria fumosorosea* · Porosity · Texturizer · Solid-state culture (SSC) · Infectivity

Introduction

Mycoinsecticides are products based on propagules of entomopathogenic fungi (EF), which are used to control or reduce populations of insect pests in the agricultural sector, being harmless to humans and other mammals [1, 2]. The majority of commercially available mycoinsecticides are based on strains of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. These species produce large amounts of aerial conidia in solid-state culture (SSC) [3–5]. The EF *I. fumosorosea* (formerly known as *Paecilomyces fumosoroseus*) infects a wide range of hosts which attack crops of great economic importance [6, 7]. The production of EF for use as biological control agents against insects requires infective units such as aerial conidia or blastospores [8]. Conidia are produced in solid substrates or on the external surfaces of infected insects [9]. In contrast, blastospores form mainly in liquid media cultures (LMC) [1]. One of the techniques commonly used to produce conidia on a large scale is SSC. Advantages of this method of production include that the conidia produced are more tolerant to desiccation, and more stable during the manufacture of complex formulations compared with conidia produced in LMC. Additionally, agroindustrial by-products (cheap raw materials) are generally used as the solid substrate [10].

The growth and metabolism of fungi are influenced by various factors including pH, temperature, moisture content, substrate particle size and gas exchange during solid-state culture [3, 11, 12]. In order to reduce the constraints imposed by limited gas transfer, which are governed by the packing of the substrate within the reactor, texturizers can be added to increase the porosity (ϵ) of the media, to reduce the compaction of the substrate and to increase the contact area between the substrate and microorganisms, thus favouring gaseous interchange [3, 13, 14]. The agents most commonly used as texturizers include straw, cotton waste, sawdust, wood chips, pruning waste (branches and dry trunks), dry grass, sugar cane bagasse and polystyrene foam [13, 14].

Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) is a weed (undesirable plant) due to its negative environmental impact on different water bodies worldwide [15]. On the other hand, this plant has many beneficial applications such as in the development of handicrafts, biogas production, treatment of oil spills and recycling of organic substances or industrial waste, as well as being used as a fertilizer and animal feed [16]. The use of common water hyacinth as a texturizer in SSC for the production of conidia of entomopathogenic fungi has not been reported.

Although it is important to maximize the production of aerial conidia, it is also essential to ensure that conidia are of a suitably quality (infectivity), since media composition influences conidial yields and quality [17]. Infectivity is the ability of the conidium to enter the host and be distributed and/or reproduce within the host [18] and can be determined via bioassays that provide parameters allowing comparison among strains or treatments [17, 9].

The aim of this study was to evaluate variations of porosity (ϵ) on the conidial production and infectivity of two strains of *I. fumosorosea* during SSC, using different proportions of rice and water hyacinth (WH amendment) in SSC mixtures.

Materials and Methods

Microorganisms, Monocolony Culture, and Propagation

The study used two strains of *I. fumosorosea*. The strain CNRCB1 (recently assigned with the key CHE-CNRCB 303) was obtained from the collection of entomopathogenic fungi from the *Centro Nacional de Referencia de Control Biológico* (CNRCB) in Tecoman, Mexico. The strain ARSEF3302 was obtained from the Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) in Ithaca, New York, USA. Both strains were identified as *I. fumosorosea*, with accession numbers in GenBank being HM209049 and HM209050 for CNRCB1 and ARSEF3302, respectively [19].

Monocolony cultures were obtained for both strains by streaking onto Sabouraud maltose agar (SMA) comprising (g L^{-1}) the following: maltose 20, meat peptone 2.5, casein peptone 2.5, yeast extract 0.5, and agar 15 (all constituents; Bioxon, Mexico), contained in 9 x 1.5 cm Petri dishes. The cultures were incubated for 10 days at 28 °C. Subsequently, reactivation through infection of *Galleria mellonella* was achieved, then conidia were taken from the dead insect and reinoculated in Petri dishes with SMA (2 %) medium containing sodium deoxycholate (0.05 %) (Sigma-Aldrich, Auckland, New Zealand); the latter is a growth inhibitor of filamentous organisms and makes it easier to obtain isolated colonies [20]. From this culture, independent colonies were propagated by streaking onto Petri dishes containing 20 mL of oat flour medium. The oat flour medium [21] contained (g L^{-1}) the following: oat flour 33.3 (Grupo Industrial Vida, Zapopan, Jalisco, México), bacteriological agar 15, and meat peptone 10 (both constituents from Bioxon, Mexico City, Mexico). The strains on the Petri dishes were then subject to long-term conservation in sterile deionized water [22]. The sporulating cultures were cut in small blocks (5 mm^2) and placed into the tubes filled with sterile deionized water, then those vials were preserved at 4 °C. Sterile glass tubes of 150 × 15 mm with screw caps were used containing 4 mL of sterile deionized water. The preservation was performed every 6 months using this method, since after this time, the viability gradually decreases [22]. Cultures were started taking one vial from the preservation by transferring aseptically a block of inoculum onto a dish of oat flour fresh medium, whose composition was described above. Propagation was carried out in Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 50 mL of oat flour medium, previously autoclaved at 15 PSI for 15 min. The flasks were incubated at 28 °C for 10 days and then were used to carry out all of the experiments.

Culture Conditions

The experimental units were glass bottles (80 mL), capped with cotton plugs, with an internal diameter (\varnothing_i) of 5 cm and a height (L) of 4.7 cm. Water hyacinth (WH amendment) was used as texturizer, obtained from *Tecnología Especializada en el Medio Ambiente* (TEMA, Mexico). Only dried leaves and stalks of WH amendment were used. Parboiled rice (PR) was used as the main substrate, parboiled rice refers to rice treated by steaming which is then commercially available as “parboiled rice” presentation by Verde Valle™ (Uruguay). Both rice and water hyacinth were passed through sieves with pore diameter 3.36, 2.88, 2.37, 2, 1.19, and 0.80 mm (no. 6, 7, 8, 10, 16, and 20 sieves, respectively); for further experiments, selected particle sizes were used for water hyacinth, 2 mm (width), and for parboiled rice, average of 2 mm (width) by 5 mm (length). The proportions of PR:WH are expressed in percentage of a total of 10 g of solid initial

dry matter. The following proportions of PR:WH (% weight:weight): were tested: 100:0, 90:10, 80:20, and 70:30. Ten grams of solid material was used in each glass bottles, the amount of rice was different depending on the treatment, parboiled rice (g): 10, 9, 8, and 7, for the mixtures PR:WH (%): 100:0, 90:10, 80:20, and 70:30, respectively. The mixtures were sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 min. The medium was inoculated with conidial suspension (1 mL) containing 1×10^7 conidia mL^{-1} , corresponding to an initial inoculum of 1×10^6 conidia per gram of initial dry matter (conidia gdm^{-1}). The inoculum was produced on 50 mL oat flour medium (described in section “Microorganisms, monoculture, and propagation”). Sterile distilled water was added to obtain a level of 40 % water content [14]. The contents of each bottle were mixed with a sterile spatula, and then, all experimental units (bottles) were placed in containers which had the following dimensions: 26.6 cm \times 11.5 cm \times 20 cm. Every container was provided with hermetic cover having inlet and outlet of air valves. These containers were incubated at 28 °C with a photoperiod of 12:12 (h), the % relative humidity in flasks was 37 % in all mixtures of PR:WH, since they were inoculated and incubated simultaneously under the same conditions.

Conidia Kinetics

Conidia production was carried out in 21 bottles per mixture of PR:WH with three bottles as negative controls (with no inoculum). Three bottles per mixture were taken each 24 h (replicates), and further experiments were performed at different times (three experiments).

Data from conidia counts were obtained using the whole 10 g of solid initial matter contained in each bottle. Solid matter from those samples was transferred to a glass beaker, and the conidia harvested using a 0.05 % Tween 80 solution (Amresco, Ohio, USA) for 10 min on a magnetic stirrer [19, 23]. Different volumes of Tween 80 (0.05 % solution) were required for each mixture employed, due to the fact that the bed height increased in accordance with the percentage of water hyacinth. Sixty milliliters of Tween 80 (0.05 % solution) was used to harvest conidia for the PR:WH (%): 100:0 and 90:10 mixtures, while 70 and 80 mL were used for the PR:WH (%): 80:20 and 70:30 mixtures, respectively. The extracts were then filtered through sterile 10 \times 10 cm gauze to eliminate the solids and obtain conidial suspensions. Serial dilutions were made, and the conidia were counted in a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany), with a light microscope (BOECO) using a \times 40 objective lens. The production levels were reported directly as conidia per gram of initial dry rice, C_r (conidia gdr^{-1}).

Porosity and Bulk Density

In order to evaluate initial porosity, 10 g of sterilized material was packed into glass bottles, and water was added to achieve an initial moisture of 40 % as water content in each mixture of PR:WH (using triplicates). Subsequently, each bottle was filled with mineral oil (REASOL™, Mexico), and the porosity fraction (ϵ) was calculated according to Mitchell et al. [24]:

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

where ϵ is the porosity fraction (dimensionless); V_t is the total volume (mL), namely, this is the volume occupied by the sample including the void volume; V_s is the volume occupied only

by the sample (mL); and the difference between V_t and V_s is the void volume (mL). The void volume was determined by the volume of mineral oil necessary to cover the height of the substrate bed; such volumes were (mL) as follows: 12.7, 21.2, 34, and 45 corresponding to PR:WH (%) values of 100:0, 90:10, 80:20, and 70:30, respectively.

The bulk density is defined as the mass of particles of a material divided by the total occupied volume. The total volume includes particle volume, interparticle void volume, and internal pore volume. The bulk density was calculated with the following expression [24]:

$$\rho_b = \frac{W_s}{V_t}$$

where ρ_b is the bulk density (g mL^{-1}); W_s is the weight of the sample (g); V_t is the total volume occupied by the sample (mL).

Evaluation of Infectivity (Bioassays)

The insect *Galleria mellonella* is a common pest in apiculture or beekeeping processes affecting the economy of this activity around the world [25]; moreover, this is an insect model to test and compared virulence of fungi [26]. Infectivity parameters obtained by bioassays allow the evaluation of the quality of conidia produced by entomopathogenic fungi [9]. The infectivity of the conidia of both strains was evaluated using *G. mellonella* larvae (Petmmal, Mexico) weighing between 62.2 and 71.6 mg. The infectivity tests were performed with conidia obtained on day 8. Seven Petri dishes were used (five dishes for infected larvae and two dishes as a negative control) with each containing ten larvae. Conidial suspensions (20 mL; 5×10^7 conidia mL^{-1}) were prepared using the aerial conidia produced in each mixture of PR:WH. Larvae were submerged for 5 s in those suspensions from each treatment [27]. The control larvae were submerged only in Tween 80 (0.05 % solution) for 5 s. After treatment, the larvae were fed with *Wax Worm* (PETMMAL, Mexico) diet to avoid death by starvation and incubated with a photoperiod of 12:12 (h) at 28 °C. Mortality was recorded every 24 h for 12 days.

In order to compare infectivity of conidia harvested from different treatments, specific parameters were estimated according to the model proposed previously [17]. These include the time at which the first dead larva appeared (t_0 , delay time), the half lethal time (LT_{50} , the time at which 50 % mortality is reached) and the percentage of survival (S) were calculated and employed in a decay model previously described by Rodríguez-Gómez et al. [17]. The model uses a first-order decay equation with the indicated delay time:

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

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

where Y is the survival (%) at time t ; k is the specific death rate (days^{-1}); t_0 is the time required for the first larval death (days); and S is the estimated asymptotic survival level (%).

Statistical Analysis

For the statistical analysis, mean conidia production values and infectivity parameters obtained for each porosity were employed. Analysis of variance (Tukey test) was used to compare

results obtained with each treatment and each given strain using one-way analysis with significance level, $p < 0.05$ with the help of SPSS program (SPSS, Chicago, IL).

Results and Discussion

Conidia Production and Porosity

The addition of water hyacinth to the mixture significantly ($p < 0.05$) increased the porosity fraction (ϵ) or empty space (Fig. 1), it was found a linear correlation ($Y = 0.0551 * X + 0.1989$; $R^2 = 0.947$), and consequently significantly ($p < 0.05$) reduced the packing density ($Y = -0.1663 * X + 0.8653$; $R^2 = 0.931$). Conidial production kinetics are presented, for CNRCB1 and for ARSEF3302 (Figs. 2 and 3), for both strains in all PR:WH mixtures, maximal conidia production was observed on day 8. For strain CNRCB1, when the conidia production was reported on the basis of gram of initial dry rice (C_r), levels were significantly different ($p < 0.05$), with the highest values (up to 1.33 times) for the 90:10 and 80:20 mixtures. Similarly, for strain ARSEF3302, the 80:20 mixture supported the highest levels of conidial production, with an increase of 1.55 times over the control level (PR:WH=100:0). However, with both strains, the 70:30 mixture had similar conidiation level as compared to control PR:WH=100:0 ($p > 0.05$).

The production of conidia by *L. fumosorosea* strains has been reported to be 1×10^9 conidia per gram of initial solid substrate [4, 28]. Present results were found to be in the range from 1.3×10^9 to 6.9×10^9 conidia per gram initial dry rice. This is a good result because it shows that taking the proposed dose 1×10^{13} conidia sprayed per hectare [8], it would require only from 1.5 up to 8 kg of substrate (rice grains) per hectare to produce the recommended dose of conidia for a single treatment in crop fields.

The water hyacinth was incorporated as a texturizer to avoid compaction of the substrate based on rice, to increase the porosity fraction (ϵ) of the bed and to promote oxygen transfer.

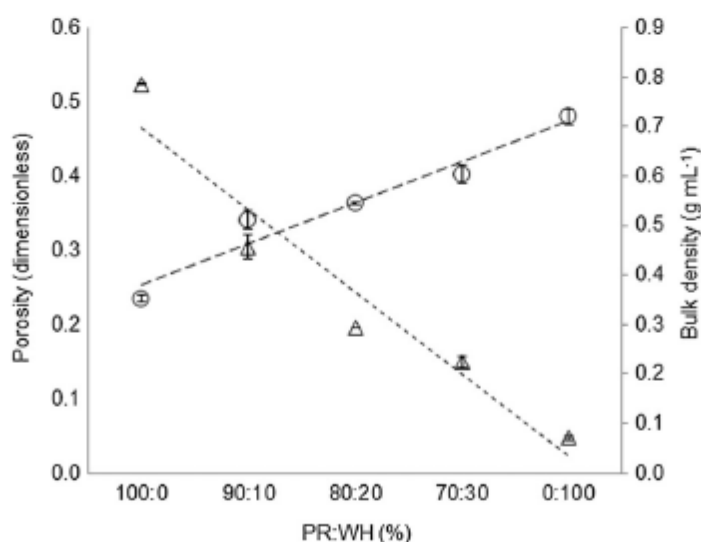


Fig. 1 Porosity (circles) and bulk density (triangles) in mixtures of parboiled rice (PR) and water hyacinth (WH amendment). Linear correlation was indicated with the dashed lines ($R^2 = 0.947$ for porosity and $R^2 = 0.931$ for bulk density)

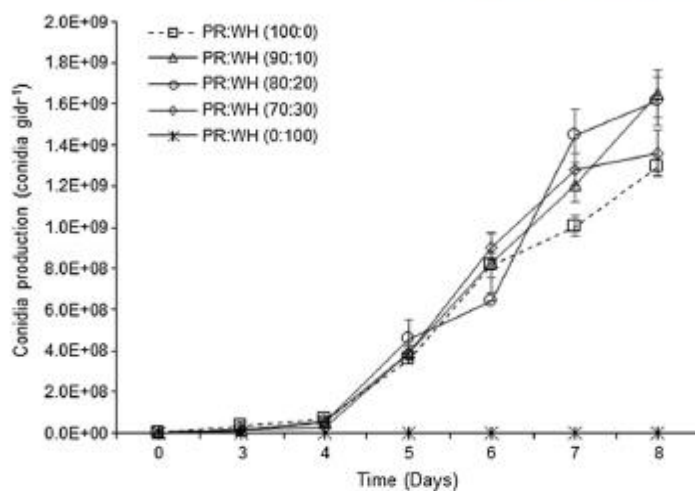


Fig. 2 Conidia production for 8 days by *Isaria fumosorosea* CNRCB1 in mixtures of parboiled rice (PR) and water hyacinth (WH amendment). C_r (conidia per gram initial dry rice)

The impact of this texturizer on conidia production was then analyzed. When 30 % texturizer was used, conidia production per gram of initial dry rice was lower compared with the other treatments and did not differ significantly from that in the control with the mixture containing PR:WH 100:0. This pattern was also observed with *Beauveria bassiana*, with higher proportions of texturizer (sugar cane bagasse) reducing conidia production per gram of total solid matter. In contrast, there was no significant difference when conidia production was reported per gram of wheat bran (the main substrate) [14]. In the present study, both strains of *I. fumosorosea* grew mainly on the rice grains (the rice was the unique substrate), there was negligible growth of mycelium on the water hyacinth, neither growth or conidiation of this microorganism was observed in the water hyacinth particles (Figs. 2 and 3). Arzumanov et al. [29] reported similar results in a SSC system using rice and sugar cane bagasse (50:50),

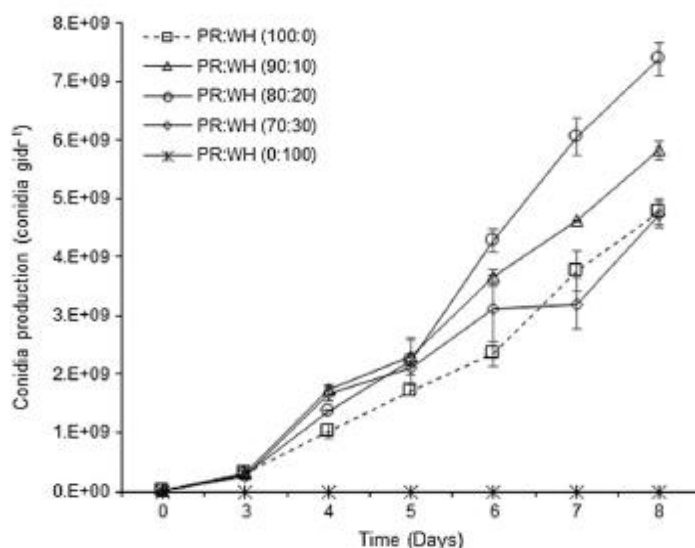


Fig. 3 Conidia production for 8 days by *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 in mixtures of parboiled rice (PR) and water hyacinth (WH amendment). C_r (conidia per gram initial dry rice)

observing that *Metarhizium anisopliae* grew almost exclusively on the grains of rice. For both strains of *I. fumosorosea*, experiments were conducted using only water hyacinth, and only a negligible growth was observed without sporulation. This shows that *I. fumosorosea* and *M. anisopliae* prefer rice as the main carbon source, possibly because the production of the lignocellulolytic enzymes, required to hydrolyze components of either water hyacinth or sugar cane baggase, is not favoured by these fungi.

The results of Figs. 1, 2, and 3 seem to support that extreme porosity values ($\epsilon \approx 0.24$ and 0.48) are less favourable for conidial production than intermediate porosity values ($\epsilon \approx 0.35 \pm 0.05$). Details on the statistical analysis of conidial production as a function of porosity in three separate experiments, each one with three replicates, are shown in Table 1. It should be noted that the negative control (PR:WH=0:100) without fungal growth and consequently, negative conidiation, showed that this effect was not related to the alternative use of water hyacinth as a substrate ($\epsilon = 0.48 \pm 0.01$).

The incorporation of the water hyacinth was effective to increase the ϵ value, reaching a critical level between 0.34 and 0.36, which increases surface area and improves exchange gaseous according to Arzumanov et al. [29]; this was related to higher conidia production. When fungi grow on a solid substrate, the packing density [3] and the height of the bed affect conidia production [13], thus a high packing density may limit the aeration and therefore the exchange of gases at the bottom of the bed. This situation could adversely affect the growth of the fungus [11].

The mechanistic explanation of why porosity has an optimal value for conidial production requires a study of the relationship between respiratory and growth functions that are beyond the aim of this work. Miranda et al. [30] and Miranda et al. [31] have shown that porosity of

Table 1 Effect of porosity in the conidia production of the CNRCB1 and ARSEF3302 strains of *Isaria fumosorosea*

Strain	ϵ^a (dimensionless)	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
		C_r^b Conidia gidr^{-1} 1×10^9	C_r^b Conidia gidr^{-1} 1×10^9	C_r^b Conidia gidr^{-1} 1×10^9
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	0.24	1.2 \pm 0.04 ^e	1.53 \pm 0.06 ^d	2.37 \pm 0.43 ^d
	0.34	1.6 \pm 0.11 ^c	2.5 \pm 0.10 ^c	4.17 \pm 0.10 ^c
	0.36	1.6 \pm 0.11 ^{c, d}	2.47 \pm 0.12 ^c	3.93 \pm 0.27 ^c
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	0.40	1.3 \pm 0.11 ^{d, e}	1.37 \pm 0.04 ^d	2.59 \pm 0.14 ^d
	0.24	4.7 \pm 0.21 ^e	4.46 \pm 0.37 ^d	1.97 \pm 0.07 ^e
	0.34	5.8 \pm 0.16 ^d	6.02 \pm 0.15 ^c	4.08 \pm 0.12 ^d
	0.36	7.3 \pm 0.28 ^c	6.89 \pm 0.75 ^c	5.07 \pm 0.25 ^c
	0.40	4.7 \pm 0.22 ^e	3.77 \pm 0.13 ^d	2.1 \pm 0.16 ^e

Three replicates were analysed at day 8

^a Porosity

^b Conidia per gram of initial dry rice

^{c, d, e} Means in the same column with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)

polyurethane as inert support has a remarkable biphasic effect on the production of reactive oxygen species and the induction of superoxide dismutase of *Aspergillus terreus*. This is an interesting area of research because it points on the importance of the structural properties of solid support that go beyond the average composition of solid substrates and highlight on possible physiological effects linked to oxygen mass transfer and occupation of the interstitial space by the mycelial mat as suggested by earlier work [32, 33]. As a practical consequence, present results indicate the need to measure porosity as a fermentation parameter that could change the yield of conidia per gram of initial substrate. They also show the possibility of modifying this structural parameter by the appropriate blending of grains easy to breakdown and fibers which are not consumed. Namely, rice grains blended with dried water hyacinth fibers.

In order to analyze whether conidia extraction may be affected by using different amount of Tween 80, a simultaneous experiment was carried out where 80 mL of Tween 80 (0.05 % solution) was used for the extraction of conidia of each bottle. For CNRCB1 strain, no significant difference ($p < 0.05$) was found in the extraction of conidia using different volumes of 0.05 % Tween 80 solution (60, 70, or 80 mL) or an equal volume (80 mL) in every treatment with different amounts of texturizer (Electronic Supplementary Material Table S1). For ARSEF3302 strain, significant difference ($p < 0.05$) was found only in the treatment PR:WH (%): 100-0 (Electronic Supplementary Material Table S2). However, the profiles of better production of conidia in the 90-10 ($\epsilon = 0.34$) and 80-20 ($\epsilon = 0.36$) mixtures were always consistent in both strains.

Conidia Infectivity Bioassays

For both strains, infectivity tests on *Galleria mellonella* were performed with conidia obtained on day 8 as described in “Material and Methods”. Figure 4 shows the typical stages of infection of *G. mellonella* larvae by *I. fumosorosea*. The parameters t_0 and LT_{50} did not differ significantly between treatments for strain CNRCB1 (Table 2). This indicates that the aerial conidia, produced in each of the mixtures, initiate the infective cycle at a similar time (between 5.9 and 6.9 days), and killed 50 % of the population between 7.9 and 8.2 days; although values for S (asymptotic survival level) differed between mixtures, conidia obtained in the PR:WH 100:0 and 90:10 mixtures reached a higher mortality, significantly different from those of other

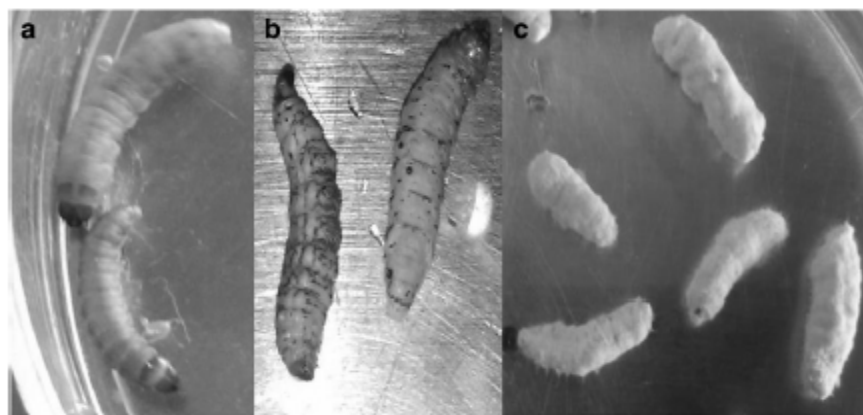


Fig. 4 Typical stages of infection of *Galleria mellonella* larvae by *Isaria fumosorosea* CNRCB1: **a**) uninfected larvae; **b**) melanised larvae, **c**) larvae with mycosis. Infectivity parameters are described in the text

treatments ($p < 0.05$). The fact that ARSEF3302 strain was less lethal to *G. mellonella* ($S \leq 50\%$) than CNRCB1 strain, made irrelevant the evaluation of LT_{50} . However, no significant difference ($p > 0.05$) in t_0 and S values was found with such strain. Thus, the mixture of water hyacinth with rice grains had no detrimental effect on infectivity parameters of those strains of *I. fumosorosea* when tested with *G. mellonella*, since the main effect was on the conidiation level.

Analysis of the infectivity parameters showed that conidia of the CNRCB1 strain achieved an S value of between 12 and 24 %, with an LT_{50} between 7.9 and 8.6 days. These values were similar to that reported recently by Carrillo-Pérez et al. [1] for aerial conidia produced in a surface culture of *I. fumosorosea* P43A in bioassays on *Galleria mellonella* larvae (8.3 ± 1.45 days). On the other hand, the conidia of strain ARSEF3302 produced an average final survival (S) of 55 %, and the t_0 was similar among all mixtures of PR:WH (6 days), similar to that of the CNRCB1 strain ($t_0 = 6.5$ days); nonetheless, ARSEF3302 strain proved to be less infective than CNRCB1 strain (Table 2). This observation is supported by another recent study showing that the ARSEF3302 strain has lower infectivity toward *Galleria mellonella* compared to strain CNRCB1 [19]. In addition, the conditions for optimal conidia production were not necessarily the optimal for obtaining high quality conidia [17, 34].

Conclusion

As concluding remarks, water hyacinth is a suitable texturizer in solid-state culture, which in turn improves the production of conidia by *I. fumosorosea* by increasing the ϵ to an optimal level. The infectivity of conidia was not altered substantially in those treatments with high conidial yields, which is an important factor to consider during the production of conidia of entomopathogenic fungi at larger scales.

Table 2 Infectivity parameters of the conidia of the CNRCB1 and ARSEF3302 strains of *Isaria fumosorosea* with *G. mellonella* as the host

Strain	ϵ^a (dimensionless)	t_0^b (days)	LT_{50}^c (days)	S^d (%)
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	0.24	6.92 ± 0.52^e	8.28 ± 0.47^e	12 ± 4.47^B
	0.34	6.67 ± 1.11^e	8.59 ± 0.48^e	$14 \pm 5.48^E, B$
	0.36	6.46 ± 0.83^e	8.09 ± 0.69^e	$22 \pm 4.47^{E, f}$
	0.40	5.92 ± 0.80^e	7.93 ± 0.23^e	24 ± 5.48^e
<i>I. fumosorosea</i> ARSEF3302	0.24	5.55 ± 0.64^e	NR ^h	42 ± 8.37^f
	0.34	6.53 ± 1.20^e	NR ^h	$50 \pm 10.0^{E, f}$
	0.36	6.55 ± 0.69^e	NR ^h	56 ± 5.48^e
	0.40	5.10 ± 0.81^e	NR ^h	58 ± 4.47^e

^a Porosity

^b Delay time, the time when first dead larva appears

^c The median lethal time, when 50 % mortality is reached

^d The percentage survival

^{e, E, B} Means in the same column with different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$)

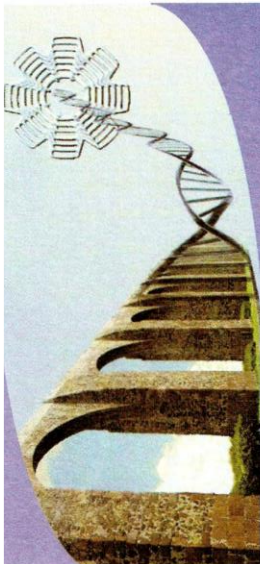
^h Not reached

Acknowledgments Alejandro Angel-Cuapio thanks the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) for the scholarship (No. 237041). The authors wish to thank the Red-Promep and projects SECITI-DF for the financial support.

References

- Carrillo-Pérez, E., Acosta-Smith, E., Montesinos-Cisneros, R. M., & de la Torre, M. (2013). Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*, 309–317.
- Zimmermann, G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, *18*, 865–901.
- Dorta, B., & Arcas, J. (1998). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, *23*, 501–505.
- Kim, J. S., Je, Y. H., & Roh, J. Y. (2010). Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *37*, 419–423.
- Ye, S., Ying, S., Chen, C., & Feng, M. (2006). New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, *28*, 799–804.
- de Faria, M. R., & Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, *43*, 237–256.
- Glare, T. R. (2004). In D. K. Arora (Ed.), *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications: Biotechnological potential of entomopathogenic fungi* (pp. 79–90). New York: CRC Press, Marcel Dekker Inc.
- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*, *55*, 129–145.
- Vega, F. E., Meyling, N. V., Luansay-hard, J. J., & Blackwell, M. (2012). In F. E. Vega & H. K. Kaya (Eds.), *Insect pathology: Fungal entomopathogenic* (pp. 171–206). San Diego: Academic Press.
- Deshpande, M. (1999). Mycopesticide production by fermentation: potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, *25*, 229–243.
- Figuroa-Montero, A., Esparza-Isunza, T., Saucedo-Castañeda, G., Huerta-Ochoa, S., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *86*, 1321–1331.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, *99*, 7842–7847.
- Kang, S., Lee, S., Yoon, C., & Kim, S. (2005). Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, *27*, 135–139.
- Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*, 771–777.
- Villamagna, A., & Murphy, B. (2010). Ecological and socio-economic impacts of invasive water hyacinth (*Eichhornia crassipes*): a review. *Freshwater Biology*, *55*, 282–298.
- Malik, A. (2007). Environmental challenge vis a vis opportunity: the case of water hyacinth. *Environment International*, *33*, 122–138.
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 513–518.
- Thomas, S. R., & Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, *85*, 146–151.
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*, *70*, 661–666.
- Montesinos-Matías, R., Viniegra-González, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2011). Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-d-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*, 2095–2102.

21. Tlecuítl-Beristain, S., Viniestra-González, G., Díaz-Godínez, G., & Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*, *169*, 387–394.
22. López-Lastra, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, *80*, 1126–1130.
23. Garza-López, P. M., Königsberg, M., Gómez-Quiroz, L. E., & Loera, O. (2012). Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 353–359.
24. Mitchell, D. A., Meien, O. F., Luz, L. F. L., Jr., & Berovič, M. (2006). In D. A. Mitchell, M. Berovič, & N. Krieger (Eds.), *Solid-state fermentation bioreactors: fundamental of design and operation: Substrate, air, and thermodynamic parameters for SSF bioreactor models* (pp. 265–278). Berlin: Springer.
25. Jafari, R., Goldasteh, S., & Afrogheh, S. (2010). Control of the wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera:pyralidae) by the male sterile technique (mst). *Archives of Biological Sciences*, *62*(2), 309–313.
26. Lionakis, M. S. (2011). *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence*, *2*(6), 521–527.
27. Fang, W., Pava-Ripoll, M., Wang, S., & St Leger, R. (2009). Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*, *46*, 277–285.
28. Mascarin, G. M., Alves, S. B., & Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *53*, 753–761.
29. Arzumanov, T., Jenkins, N., & Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Process Biochemistry*, *40*, 1037–1042.
30. Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mejía, A., & Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: differences and similarities in submerged- and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, *117*, 85–93.
31. Miranda, R. U., Gómez-Quiroz, L. E., Mendoza, M., Pérez-Sánchez, A., Fierro, F., & Barrios-González, J. (2014). Reactive oxygen species regulate lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus* during submerged and solid-state fermentations. *Fungal Biology*, *118*, 979–989.
32. Auria, R., Palacios, J., & Revah, S. (1991). Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *39*, 898–902.
33. Volke-Sepúlveda, T. L., Gutiérrez-Rojas, M., & Favela-Torres, E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresorce Technology*, *87*, 81–86.
34. Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., & Arcas, J. A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*, 481–488.



Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Otorga la presente

Constancia

Rafael Alejandro Angel Cuapio, Mina Konigsberg Fainstein,
Ernesto Favela Torres, Octavio Loera

Por la presentación del **Cartel** "PRODUCCION DE CONIDIOS DE
HONGOS ENTOMOPATOGENOS SOBRE ARROZ Y LIRIO COMO
TEXTURIZANTE"

En el **XIV** Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Juriquilla, Querétaro, 19 al 24 de Junio, 2011

Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Presidente de la SMIBB

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Presidente del Comité Organizador

Dr. Octavio Loera Corral
Presidente del Comité Científico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE MORELOS

La Universidad Autónoma del Estado de Morelos
a través del Cuerpo Académico
Gestión y Biotecnología y Biotecnología y Biotecnología

Obtenga el presente

RECONOCIMIENTO

a

R. ALEJANDRO ANGEL-CUAPIO, ERNESTO FAVELA-TORRES, OCTAVIO LOERA

Por la ponencia denominada:

PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN CULTIVO EN SOPORTE SÓLIDO

Impartida durante el II Simposio La situación de los plaguicidas en México: impactos y perspectivas, celebrado del 12 al 14 de octubre de 2011 en Cuernavaca, Morelos.

Dr. Javier Siqueiros Alatorre
Secretario Académico UAEM

Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández
Responsable Cuerpo Académico





**La Sociedad Mexicana de Control Biológico, A. C.
otorga la presente CONSTANCIA a
Angel-Cuapio R. Alejandro, Isabelle Gaime-Perraud,
Ernesto Favela-Torres, Octavio Loera**

**por su participación como
PONENTES**

Con el tema: "PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Isaria fumosorosea* CNRCB1 SOBRE
ARROZ Y LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE"

**en el XXXV Congreso Nacional de Control Biológico,
celebrado del 7 al 9 de noviembre de 2012 en la
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla, México.**



María Cristina del Rincón Castro
Presidenta de la Sociedad
Mexicana de Control Biológico



Jorge Cebada Ruiz
Presidente del Comité Local
del XXXV Congreso
Nacional de Control Biológico





La Sociedad Mexicana de Control Biológico, A. C.
otorga la presente CONSTANCIA a
Angel-Cuapio R. Alejandro, Isabelle Gaime-Perraud,
Ernesto Favela-Torres, Octavio Loera

por su participación como
PONENTE

Con el tema: "EFECTO DE LA AIREACIÓN EN CULTIVO SOBRE SUSTRATOS SÓLIDOS PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae*."

en el XXXV Congreso Nacional de Control Biológico,
celebrado del 7 al 9 de noviembre de 2012 en la
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,
Puebla, México.



María Cristina del Rincón Castro
Presidenta de la Sociedad
Mexicana de Control Biológico



Jorge Cebada Ruiz
Presidente del Comité Local
del XXXV Congreso
Nacional de Control Biológico





National Congress of
**Biotechnology and
 Bioengineering**



GIM2013
 12th International Symposium on the
**GENETICS OF INDUSTRIAL
 MICROORGANISMS**

CERTIFICATE OF PRESENTATION

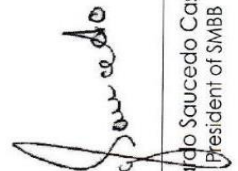
We hereby certify that


R. Alejandro Angel-Cuapio, Isabelle Gaime-Perraud, Ernesto Favela-Torres, Octavio Loera


Delivered the Poster presentation

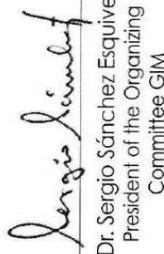
WATER HYACINTH AS A SUITABLE TEXTURIZER IN SOLID CULTURES FOR THE PRODUCTION OF CONIDIA OF *Isaria fumosorosea*

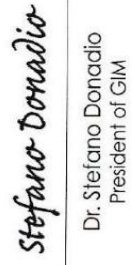
XV National Congress of Biotechnology and Bioengineering and
 12th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.
 June 23rd - 28th, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.


 Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
 President of SMBB


 Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
 President of the Organizing Committee
 SMBB


 Dra. Romina Rodríguez Sanoja
 President of the Scientific
 Committee SMBB/GIM


 Dr. Sergio Sánchez Esquivel
 President of the Organizing
 Committee GIM


 Dr. Stefano Donadio
 President of GIM



La Sociedad Mexicana de Control Biológico, A.C.
y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca;

Extienden la presente

Constancia

A

R. Alejandro Ángel-Cuapio

Por su participación con la Presentación Oral:

«PRODUCCIÓN E INFECTIVIDAD DE CONIDIOS DE *Isaria fumosorosea* OBTENIDOS POR CULTIVO EN SOPORTE SÓLIDO
CON LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE»

R. Alejandro Ángel-Cuapio, Isabelle Gaime-Perraud, Ernesto Favéla-Torres, Katushka Arevaldo y Octavio Loera.

En el XXXVI CONGRESO NACIONAL DE CONTROL BIOLÓGICO,

Realizado en la Ciudad de Oaxaca de Juárez los días 7 y 8 de noviembre de 2013.

Dr. Myriam Cuapio del Hincón Castro
Presidenta de la Sociedad Mexicana de Control Biológico, A.C.

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, noviembre de 2013.

Dr. Rafael Pérez Pacheco
Director del CIIDIR Unidad Oaxaca





The Fourth International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering



Cinvestav



CONACYT



For the Oral presentation entitled:

ANÁLISIS DE RESPIROMETRÍA EN LA PRODUCCION DE CONIDIOS DE *Isaria fumosorosea* EN CULTIVO EN SOPORTE SÓLIDO

Alejandro Angel-Cuapio, Ernesto Favela-Torres, Isabelle Perraud-Gaime, Octavio Loera

Certificate of Participation to:

During "The 4th International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering" held on September 9-12, 2014 in Mexico City, Mexico.

Dr. Fernando Esparza-García
Honor President

Dr. Héctor M. Poggi-Varaldo
Chair

Prof. Elvira Ríos Leal
Chair

Dr. Omar Solorza-Feria
Chair





SOCIEDAD MEXICANA
DE CONTROL BIOLÓGICO

otorga el presente

Reconocimiento

a:

**Alejandro Angel-Cuapio, Ernesto Favela-Torres, Isabelle
Perraud-Gaime, Octavio Loera**

por su participación como ponente de los avances y resultados
de su trabajo de investigación científica en el

XXXVII Congreso Nacional de CONTROL BIOLÓGICO

Mérida, Yucatán, 7 de Noviembre de 2014

J. Isabel López Arroyo

Dr. J. Isabel López Arroyo
Presidente de la Sociedad Mexicana
de Control Biológico

Mónica Gpe. Lozano Contreras

Dra. Mónica Gpe. Lozano Contreras
Presidente del Comité Organizador
Local



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente

Constancia

A: Alejandro Angel-Cuapio, Gustavo Viniegra-González, Ernesto Favela-Torres, Isabelle Perraud-Gaime, Octavio Loera

Por su participación con la Presentación en Cartel

"LA POROSIDAD DETERMINA LOS PERFILES DE RESPIRACIÓN Y CONDIACIÓN DE Isaria fumosorosea CNRCB1 EN CULTIVO SÓLIDO"

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente de la SMBB

Dr. Carlos Regalado González
Presidente del Comité Organizador

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Científico



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00167
Matrícula: 209381382

USO DEL LIRIO ACUATICO COMO TEXTURIZANTE EN LA PRODUCCION DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS EN CULTIVO EN SOPORTE SOLIDO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 17:00 horas del día 18 del mes de marzo del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES
DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO
DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

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


Aprobar

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





RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO
ALUMNO

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS




DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



DR. ERNESTO FAVELA TORRES

VOCAL



DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

VOCAL



DR. ARTURO ALEJANDRO FIGUEROA MONTERO

SECRETARIA



DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD