
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**“PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ARROZ Y
LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

INGENIERO BIOQUÍMICO INDUSTRIAL

Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

Dra. MINA KONIGSBERG FAINSTEIN

DIRECTOR DE TESIS

ASESOR

ASESOR

SEPTIEMBRE 2011

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F. a 5 de Septiembre del 2011.

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

**PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS SOBRE ARROZ Y
LIRIO ACUÁTICO COMO TEXTURIZANTE**

que presentó

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. Mina Konigsberg Fainstein
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

JURADO

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

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

Vocal: Dra. Luz María Zenit Tovar Castro
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Vocal: Dr. Arturo Alejandro Figueroa Montero
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

The image shows three handwritten signatures, each written over a horizontal line. The top signature is the most stylized and difficult to read. The middle signature appears to be 'Isabelle'. The bottom signature is also stylized but more legible than the top one.

Al CONACYT por la beca otorgada (275592)

Agradecimientos

A mis padres, María del Rocio Cuapio y Rafael Angel por su amor y por creer en mí siempre.

A mi hermano Israel Angel por estar conmigo a pesar de la distancia.

Al Dr. Octavio Loera por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por su disposición para dirigir esta tesis, por su apoyo.

Al Dr. Ernesto Favela por su guía durante el desarrollo de este trabajo, por sus acertados comentarios, por su amistad.

A los Drs. Luz María Tovar y Arturo Figueroa por sus observaciones y sugerencias.

A la Dra. Isabelle Gaime por la revisión de este documento.

A Yolanda Escamilla por compartir conmigo esta aventura, por su apoyo, amistad, cariño y paciencia.

A mis amigos del laboratorio W104. A Roberto Montesinos, Armando Ordaz, Paul Garza, Francisco Martínez, Francisco Miranda, Nohemi García, Jazmín Méndez, Oscar Arce, Eric Ortega, Virginia Sillas, Josefa Espitia, por impulsarme en los momentos más difíciles, por sus enseñanzas.

A mis amigos de la Planta Piloto 4. A Tere Torres, Arturo Figueroa, Luz Tovar, Antonio Martínez, Blanca Hernández, Ricardo Hernández, Daniel Torres; porque siempre me alentaron para no desistir.

A la familia Herrera-Martínez por su empeño en ayudarme incondicionalmente en un momento crítico de mi vida, por su generosidad y cariño.

Gracias a todos.

Resumen

La aplicación controlada de agentes de control biológico tales como: bacterias, hongos, virus, nematodos y protozoarios, implica el mejoramiento de los cultivos, al proteger las plantas del deterioro producido por insectos plaga. En la naturaleza, los hongos entomopatógenos (entomon: insecto, pathos: enfermedad, gennan: engendrar) pueden eliminar o controlar las plagas y constituyen, además el grupo de mayor importancia del control biológico, algunos géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium*.

Los conidios son las unidades infectivas más importantes en los hongos entomopatógenos y una técnica para su producción es el cultivo en soporte sólido (CSS). En esta investigación se evaluaron diferentes volúmenes (30, 60 mL y dos extracciones con 30 mL) de Tween 80 al 0.05% sobre la extracción de conidios. Posteriormente, se determinó el efecto de la cantidad de sustrato en la producción de conidios, usando 10 y 20 g de arroz precocido, equivalente a dos alturas de lecho del sustrato, 0.5 y 1 cm, respectivamente; después se probó el efecto del recipiente (botellas serológicas y frascos GERBER®). Todos estos factores incidieron para encontrar mayores rendimientos de conidios por gramo de soporte seco inicial (gssi).

Dentro de las aportaciones de este trabajo se determinó el efecto del lirio acuático (el cual es una plaga en los cuerpos de agua dulce en México y otras regiones del mundo) como texturizante en los cultivos sólidos. Para ello se probaron dos tratamientos: arroz (100%) y una mezcla de arroz-lirio (90%-10%). Se calcularon los parámetros de calidad de conidios como hidrofobicidad (H), viabilidad (V) y germinación (G). Finalmente se realizaron estudios con aireación forzada, análisis de respirometría y pruebas de calidad; empleando los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* CP-OAX e *Isaria fumosorosea* CNRCB1.

Las extracciones de conidios se hicieron con 60 mL de Tween (0.05%) porque se requiere menos tiempo (10 minutos) para efectuarlo y con ello una extracción del 85%; en este caso se encontró que con una altura de lecho menor (0.5 cm) se obtuvo un mayor rendimiento de 3.9×10^8 conidios/gssi (caso de *M. anisopliae* CP-OAX) y no hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$) al usar 0.5 o 1 cm de altura de lecho (caso de *I. fumosorosea* CNRCB1). Los frascos GERBER® favorecieron los rendimientos de conidios para ambos hongos lo que indicó que la geometría del recipiente influyó en los perfiles de la producción de conidios.

El lirio acuático resulta conveniente como texturizante para el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 en CSS sin aireación forzada, puesto que, al combinarlo con arroz, el rendimiento de conidios se incrementa en 7.5%, sin alterar las variables de calidad de V y G. Por el contrario, para *M. anisopliae* CP-OAX los rendimientos de conidios disminuyen al incluir el lirio en el medio de cultivo así como los variables de calidad H y V. Por otro lado, para ambos hongos entomopatógenos la aireación forzada constante repercutió negativamente en los rendimientos de conidios así como en los parámetros de calidad.

Índice general

1. Introducción.	1
1.1. Control biológico.	1
1.2. Hongos entomopatógenos.	2
1.2.1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto.	3
1.2.2. Colonización del hemocele.	3
1.2.3. Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto.	4
1.3. Producción de conidios.	5
1.4. Parámetros de calidad.	7
1.4.1. Viabilidad.	7
1.4.2. Germinación.	8
1.4.3. Hidrofobicidad.	8
1.5. Lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>).	8
1.6. Texturizantes	10
2. Antecedentes.	11
3. Justificación.	13
4. Hipótesis.	14
5. Objetivos.	14
5.1. Objetivo general.	14
5.2. Objetivos específicos.	14
6. Materiales y métodos (diagrama de flujo).	15
6.1. Obtención de cultivos monoclonia	16
6.2. Propagación del microorganismo.	16
6.3. Conservación del microorganismo.	17
6.4. Extracción de conidios.	18
6.5. Efecto de la altura del lecho sobre la producción de conidios.	19
6.6. Efecto del tipo de recipiente en la producción de conidios.	19
6.7. Producción de conidios sin aireación forzada (aireación natural).	20
6.8. Producción de conidios con aireación forzada (suministro de aire) y análisis de respirometría.	21
6.9. Parámetros de calidad.	22
6.9.1. Hidrofobicidad.	22
6.9.2. Germinación.	22
6.9.3. Viabilidad.	23
6.10. Análisis estadístico.	23
7. Resultados y discusión.	24

7.1 Obtención de cultivos monoclonia, conservación y viabilidad de los hongos <i>Isaria fumosorosea</i> CNRCB1 y <i>Metarhizium anisopliae</i> CP-OAX. _____	24
7.2. Extracción de conidios. _____	26
7.3. Efecto de la altura del lecho en la producción de conidios. _____	27
7.4. Efecto del tipo de recipiente en la producción de conidios. _____	30
7.5. Producción de conidios sin aireación forzada (aireación natural) y parámetros de calidad. _____	33
7.6. Producción de conidios con aireación forzada (suministro de aire), parámetros de calidad y análisis de respirometría. _____	39
7.6.1. Producción de conidios en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%) _____	39
7.6.2 Estudios de respirometría _____	47
8. Conclusiones. _____	51
9. Perspectivas. _____	51
10. Referencias. _____	52
11. Anexo. _____	58
11.1. Cédula de identificación del lirio acuático (<i>Eichhornia crassipes</i>). _____	58
11.2. Cálculos de flujo de aire constante para CSS. _____	59
11.3. Análisis de respirometría. _____	60

Índice de tablas

Tabla 6.6. Dimensiones de los recipientes utilizados en CSS. _____	20
Tabla 7.1. Porcentajes de viabilidad de los HE conservados. _____	25
Tabla 7.4. Comparación de rendimientos de conidios para HE. _____	32
Tabla 7.5. Resumen de rendimientos de conidios para ambos hongos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$). _____	38
Tabla 7.6.1. Porcentajes de humedad (%H) y actividad de agua (a_w) de los cultivos sólidos con aireación forzada de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1. _____	46
Tabla 7.6.2. Porcentajes de humedad (%H) y actividad de agua (a_w) de los cultivos sólidos con aireación forzada de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX. _____	47
Tabla 7.6.2.1. Parámetros de crecimiento para <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 con aireación forzada. _____	50
Tabla 7.6.2.2. Valores de μ_{CO_2} para HE en CSS, reportados por otros autores. _____	50

Índice de figuras

Figura 1.2. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (modificado de Hajek y St Leger, 1994). _____ 3

Figura 1. 2. 3. Sitios potenciales para el ingreso de un patógeno en insectos (modificado de Boucias y Pendland, 1998). _____ 4

Figura 1.5. Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*). _____ 9

Figura 6.1. Cultivos monoclonia de *I. fumosorosea* CNRCB1 (derecha) y *M. anisopliae* CP-OAX (izquierda). _____ 16

Figura 6.2. Los HE *I. fumosorosea* CNRCB1 (derecha) y *M. anisopliae* CP-OAX (izquierda). 17

Figura 6.3. Viales de conservación de los hongos *I. fumosorosea* CRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX _____ 17

Figura 6.4. Desecador de plástico para cultivo de HE. _____ 18

Figura 6.5. Frascos con arroz precocido (sustrato), 10g (derecha) y 20 g (izquierda). _____ 19

Figura 6.6. Unidades experimentales para cultivo con 10 g de sustrato, frasco (derecha) y botella serológica (izquierda). _____ 20

Figura 6.7. Unidades experimentales con 10 g de sustrato, arroz (100%) a la izquierda y arroz-lirio (90%-10%) a la derecha. _____ 21

Figura 6.8. Reactores de charolas conectados en línea al metabolímetro. _____ 21

Figura 7.1.1. Cultivos monoclonia; a) *M. anisopliae* CP-OAX, b) *I. fumosorosea* CNRCB1. _ 24

Figura 7.1.2. Conservación en agua desionizada a) *M. anisopliae* CP-OAX, b) *I. fumosorosea* CNRCB1. _____ 24

Figura 7.3.1. Crecimiento del hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 en 10 g de arroz (izquierda) y en 20 g de arroz (derecha). _____ 29

Figura 7.3.2. Crecimiento del hongo *M. anisopliae* CP-OAX en 10 g de arroz (izquierda) y en 20 g de arroz (derecha). _____ 29

Figura 7.5. Crecimiento de los HE sobre una mezcla de arroz-lirio (90%-10%), a) *M. anisopliae* CP-OAX y b) *I. fumosorosea* CNRCB1. Fotografía tomada en el día de mayor producción de conidios 6 y 7, respectivamente. _____ 38

Índice de gráficas

Gráfica 7.2. Rendimientos de conidios para <i>M. anisopliae</i> CP-OAX, usando diferentes volúmenes de Tween 80 al 0.05% para la extracción. _____	27
Gráfica 7.3. Rendimientos de conidios de HE en 10 y 20 g de sustrato. _____	28
Gráfica 7.4.1. Cinéticas de producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en CSS con frascos y botellas serológicas. Se especifican los rendimientos en el día 7. _____	30
Gráfica 7.4.2. Cinéticas de producción de conidios por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en CSS con frascos y botellas serológicas. Se especifican los rendimientos en el día de mayor producción de conidios (día 6). . _____	31
Gráfica 7.5.1. Cinéticas de producción de conidios por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). _____	33
Gráfica 7.5.2. Germinación, hidrofobicidad y viabilidad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 determinadas en el día 7. _____	34
Gráfica 7.5.3. Cinética de producción de conidios por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Se especifican los rendimientos en el día de mayor producción (día 6). _____	35
Gráfica 7.5.4. Germinación, hidrofobicidad y viabilidad de los conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX determinadas en el día 6. _____	36
Gráfica 7.6.1.1. Cinéticas de producción de conidios con aireación forzada por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). _____	40
Gráfica 7.6.1.2. Rendimientos de conidios obtenidos con y sin aireación forzada por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en el día de mayor producción de conidios (día 7), creciendo sobre arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). _____	41
Gráfica 7.6.1.3. Parámetros de calidad de los conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 con aireación forzada, cosechados en el día 7. _____	42
Gráfica 7.6.1.4. Cinéticas de producción de conidios con aireación forzada por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Se especifican los rendimientos en el día 6. _____	43
Gráfica 7.6.1.5. Rendimientos de conidios obtenidos con y sin aireación forzada por <i>M. anisopliae</i> CP-OAX en el día de mayor producción de conidios (día 6), creciendo sobre arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). _____	44
Gráfica 7.6.1.6. Parámetros de calidad de los conidios de <i>M. anisopliae</i> CP-OAX con aireación forzada, cosechados en el día de mayor producción de conidios (día 6). _____	45
Gráfica 7.6.2.1. Perfiles de velocidad de producción de CO ₂ por <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%) durante 7 días de cultivo. _____	48
Gráfica 7.6.2.2. Evolución de CO ₂ y rendimiento de conidios de <i>I. fumosorosea</i> CNRCB1. ____	49

Lista de símbolos y abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico	M	molar
a_w	actividad de agua	nm	nanómetros
SDA	agar dextrosa Sabouraud	O ₂	oxígeno
AMS	agar maltosa Sabouraud	%	porcentaje
PDA	agar papa dextrosa	% h	porcentaje de humedad
YPDA	agar-extracto de levadura peptona-dextrosa	% O ₂	porcentaje de oxígeno
Al	altura del lecho	P	productividad
h	altura del recipiente	C/N	relación carbono nitrógeno
X	biomasa seca	Y _{C/X}	rendimiento de conidios en relación a la biomasa
cm	centímetro	C	rendimiento de conidios
cm ²	centímetro cuadrado	rpm	revoluciones por minuto
CSS	cultivo en soporte sólido	SC	suspensión de conidios
DO _{ac}	densidad óptica en la fase acuosa	μ	tasa específica de crecimiento
DO _{total}	densidad óptica total	μ _{CO₂}	tasa máxima específica de producción de CO ₂
∅ _{boquilla}	diámetro de boquilla	K	tasa específica de muerte
∅ _i	diámetro interno	t _o	tiempo en aparecer el primer insecto muerto
CO ₂	dióxido de carbono	LT ₅₀	tiempo letal 50
Ec	espacio de cabeza	t ₁₀	tiempo para obtener un rendimiento de 1X10 ¹⁰ conidios/gss
G	germinación	U/gssi	unidad de actividad enzimática por gramo de soporte seco inicial
°C	grado centígrado	UFC	unidades formadoras de colonias
g	gramos	V	viabilidad
gmsi	gramos de materia seca inicial	v	volumen
gssi	gramos de soporte seco inicial		
H	hidrofobicidad		
HE	hongos entomopatógenos		
ITS	internal transcribed spacer (espaciador transcrito interno)		
L	litro		
PSI	libras por pulgada cuadrada		
m ³	metros cúbicos		
μL	microlitros		
mg	miligramos		
mL	mililitros		
mm	milímetros		
mm ²	milímetros cuadrados		

1. Introducción

1.1. Control biológico.

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos son las plagas agrícolas. El uso indiscriminado de insecticidas sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, el resurgimiento de nuevas plagas y la contaminación ambiental (**Gindin y col., 2009; Shah y Pell, 2003**). El manejo integrado de plagas (MIP), que se basa en principios totalmente ecológicos, considera todo el agro-ecosistema en su conjunto. Como tal, comprende la aplicación armónica de diferentes métodos de control, como la lucha biológica y las prácticas culturales que requiere el cultivo, teniendo en cuenta los niveles poblacionales de las plagas y enfermedades a controlar, la presencia de los bio-reguladores naturales, las etapas fenológicas del cultivo y las condiciones ambientales presentes (**Alatorre-Rosas, 2006**).

Uno de los componentes del MIP es el control biológico de las plagas agrícolas mediante parasitoides, predadores (entomófagos) y organismos entomopatógenos que pueden ser hongos, bacterias, virus, nemátodos y protozoarios. Todos los insectos son susceptibles de ser afectados por algún hongo, 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 (**Elizalde-Blancas, 2006; Jackson y col., 2010**). El uso de hongos entomopatógenos (HE) para el control de tales insectos constituye, por lo tanto un componente importante, siendo muchos los hongos mencionados en diversos estudios que se usan para este propósito. Los hongos como *Beauveria* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii*, *Isaria* (*Paecilomyces*) spp., son comunes en el campo. Estos hongos tienen un amplio rango de hospederos y se han utilizado para controlar diversas plagas en diferentes lugares (**Butt y col., 2001; Jackson y col., 2010**).

Las principales ventajas de los HE son (**Kamp y Bidochka, 2002; Glare, 2004**):

1. Presentan grados variables de especificidad, pueden ser específicos a nivel de familia o especies muy relacionadas.
2. Si el entomopatógeno encuentra las condiciones adecuadas para introducirse y colonizar un ecosistema, se reproduce y renueva en forma continua, es decir, se vuelve persistente, haciendo innecesarias nuevas aplicaciones.

3. Se pueden aplicar mezclas de hongos entomopatógenos con dosis subletales de insecticidas, logrando efectos sinérgicos superiores a los logrados con aplicaciones de cada producto por separado.
4. No contaminan el medio ambiente ni afectan al hombre u otros animales superiores.
5. Cuando el hongo no llega a causar la muerte directamente, se presentan efectos secundarios que alteran el desarrollo normal del ciclo de vida del insecto.

Pero también presentan algunas desventajas como **(Boucias y Pendland, 1998; Cañedo y Ames, 2004; Glare, 2004)**:

1. Sensibilidad a la variación de las condiciones climáticas como temperaturas extremas, desecación y luz ultravioleta.
2. No matan instantáneamente. Alcanzan buenos niveles de control entre una y tres semanas después de la aplicación, dependiendo de la plaga y del ambiente.

1.2. Hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico se utilizan en diferentes países, como una alternativa viable para regular los insectos fitófagos que afectan cultivos de importancia económica dentro de un programa de manejo de plagas **(Alatorre-Rosas, 2006)**. La mayoría de los bioplaguicidas elaborados con base en HE comercialmente disponibles en el mercado incluyen cepas de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria (Paecilomyces) fumosorosea*; estas especies producen una cantidad considerablemente grande de conidios asexuales en un cultivo, así como en los insectos infectados, lo que facilita la dispersión en el campo **(Butt y col., 2001; Glare, 2004)**.

Los conidios (esporas asexuales) son responsables de la infección y se dispersan en el medio ambiente debido a las corrientes del viento, o bien por el mismo insecto que se encuentre infectado al entrar en contacto con uno sano. Cuando los conidios están sobre la cutícula de un huésped, se fijan y germinan, iniciando una serie de cascadas de reacciones de reconocimiento y activación de enzimas, tanto por el huésped como por el hongo **(Boucias y Pendland, 1998; Cañedo y Ames, 2004; Montesinos-Matías y col., 2011)**. La enfermedad producida por hongos se llama micosis. **Elizalde-Blancas, (2006)**

menciona que el desarrollo de la micosis puede ser llevado a cabo en tres fases descritas a continuación (Figura 1.2):

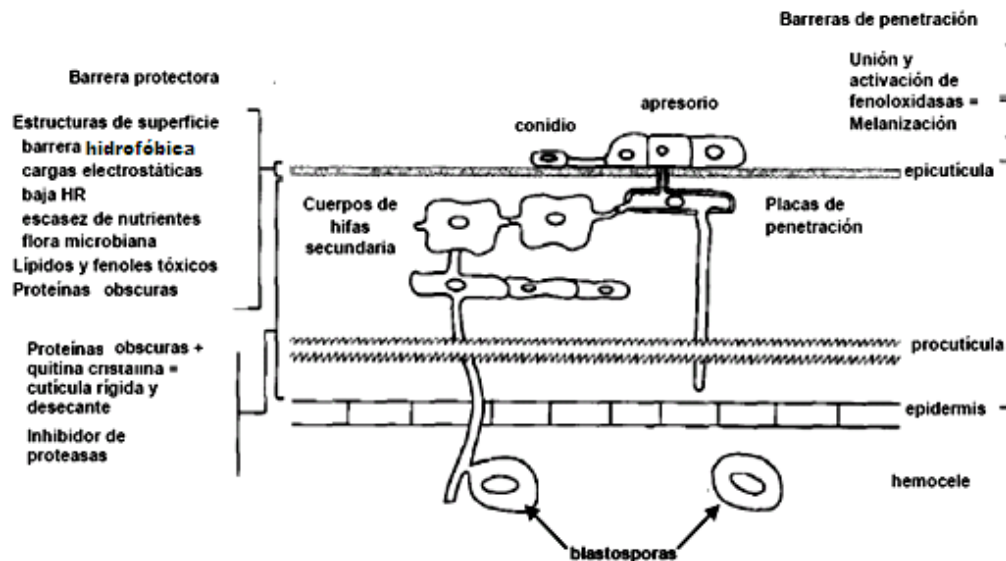


Figura 1.2. Estructura y composición de la cutícula de insectos y forma de penetración de hongos entomopatógenos (modificado de Hajek y St Leger, 1994).

1.2.1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto.

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer y alargarse da origen a las hifas que penetran la cutícula, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda en la perforación de la cutícula. El éxito de la germinación y penetración no dependen necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Shah y Pell, 2003; Elizalde-Blancas, 2006).

1.2.2. Colonización del hemocele.

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el apresorio. Además, depende de las propiedades de la cutícula, grosor, presencia de sustancias nutricionales y antifúngicas (Elizalde-Blancas, 2006), así como del estado de desarrollo del insecto. El integumento

o tegumento (figura 1.1); formado por una sucesión de capas, de adentro hacia afuera éstas son: membrana basal, epidermis o hipodermis y cutícula (epicutícula y procutícula) es degradada por los hongos mediante enzimas como proteasas, aminopeptidasas, lipasas, esterases y quitinasas (**Montesinos-Matías y col., 2011**).

1.2.3. Desarrollo del hongo que resulta en la muerte del insecto.

Luego de que llegue al hemocele, el hongo puede evitar la defensa inmune del insecto produciendo células parecidas a levaduras, llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente desarrollando protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante (**Pérez, 2004**) y produciendo micotoxinas (**Glare, 2004**). La dispersión de éstos en el hemocele depende de la especie del hongo.

Los HE, además, pueden infectar a los insectos a través de las aberturas corporales como son cavidad bucal, espiráculos y otras aberturas externas (Figura 1.2.3). Las esporas pueden germinar rápidamente en estos ambientes por ser húmedos. Cuando lo hacen en los fluidos digestivos, en este caso, el insecto no muere de micosis sino a causa de las toxinas (**Boucias y Pendland, 1998**).

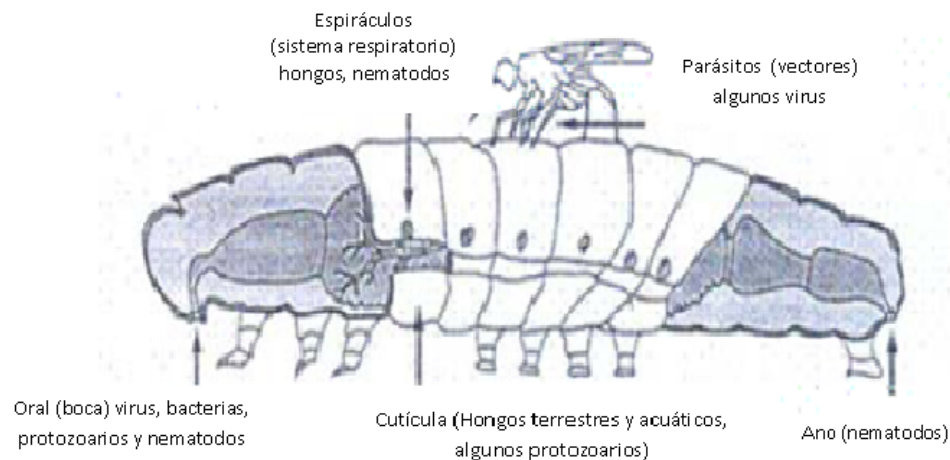


Figura 1. 2. 3. Sitios potenciales para el ingreso de un patógeno en insectos (modificado de Boucias y Pendland, 1998).

1.3. Producción de conidios.

Las unidades infectivas más efectivas son los conidios, pero no hay un conocimiento universal de un factor que influya en la obtención de esporas, sin embargo, se han reportado diferentes trabajos de investigación que conllevan a la mejoría en el rendimiento y esporulación de hongos entomopatógenos. Dentro de las variables estudiadas se encuentran la producción de conidios en diferentes sustratos orgánicos y sintéticos, atmósferas enriquecidas con O₂ o CO₂, los porcentajes de humedad del sustrato y proporciones de texturizante, entre otras.

Para evaluar la influencia del sustrato en la fisiología y virulencia de la cepa *Beauveria bassiana*, **Rodríguez-Gómez y col. (2009)** usaron dos aislados de *B. bassiana* (tipo silvestre y mutante) y compararon su crecimiento en medios de cultivo basados en salvado de trigo, exoesqueletos de saltamontes, quitina coloidal o agar dextrosa Sabouraud (SDA). La influencia del medio de cultivo en la virulencia fue determinada contra larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. Se alcanzó una mortalidad mayor al 90% en adultos de *T. molitor*, utilizando conidios provenientes de todos los medios de cultivo; mientras que para larva un 80% de mortalidad fue obtenida usando conidios colectados del medio SDA, y entre 15 y 35% con conidios de otros medios. La investigación concluye que los dos estadios de crecimiento de *T. molitor* y la composición del medio de cultivo pueden cambiar los patrones de virulencia y los niveles de producción de conidios para cada aislado.

En las investigaciones realizadas en medios sintéticos destacan los siguientes: el trabajo reportado por **Shimazu (2009)** para la producción de conidios de *Fusarium coccophilum*, en donde se evaluaron diferentes medios de cultivo, se propone el medio que contiene la composición siguiente (g/100mL agua destilada): peptona, 0.1; extracto de levadura, 0.1; sacarosa, 2; y agar 1.5, ya que es fácil de preparar, práctico y se obtiene un rendimiento de 3.4×10^4 conidios/cm² placa. Mientras que **Kamp y Bidoshka (2002)** encontraron que aislados de los HE *Metarhizium anisopliae* y *B. bassiana* mostraron mayor producción de conidios en el medio agar-papa- dextrosa (PDA) con una altura del medio (profundidad) de 2 mm, mientras que el hongo *Lenaniciillium* (*Verticillium*) *lecanni* mostró mayor producción de conidios en el medio agar-extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPDA), independientemente de la altura. Se concluye que la producción de conidios no solo depende del aislado sino del tipo de medio de cultivo y la altura.

Para evaluar la producción de conidios y su calidad en *Metarhizium anisopliae* var. *Lepidiotum* **Tlecuítl-Beristain y col. (2010)** reportan diferentes medios de cultivo que contienen harina de arroz o de avena como fuente de carbono y peptona de carne como fuente de nitrógeno (g/L), incubando a 28 °C: a) harina de arroz 33.3; b) harina de avena 33.3; c) harina de arroz 33.3 y peptona 10; y d) harina de avena 33.3 y peptona 10. La peptona incrementa los rendimientos de conidios independientemente del sustrato utilizado; sin embargo, los rendimientos más altos fueron obtenidos usando el medio de harina de avena. Además, se determinó el efecto del O₂ en la producción de conidios usando un medio avena-peptona y se estudió en una atmósfera normal (21% O₂) y pulsos enriquecidos de oxígeno (26% O₂) con recambios cada 24 h; la máxima producción de conidios (4.25X10⁷ conidios/cm²) se obtuvo usando pulsos con 26% O₂ después de 156 h de cultivo, que fue mayor al 100% con respecto a los niveles de conidios producidos bajo una atmósfera normal. El rendimiento de conidios por gramo de biomasa fue 2.6 veces mayor con 26% O₂ (1.12X10⁷ conidios/mg). Por otro lado, los parámetros de calidad de conidios, tales como germinación e hidrofobicidad no muestran diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre estos tratamientos.

Otra investigación enfocada en la producción de conidios y amilasas de *B. bassiana*, es la realizada por **Garza-López y col. (2011)**, que describen el CSS de este hongo entomopatógeno, utilizando arroz como soporte sólido y fuente de carbono, con un inóculo de 1X10⁶ conidios por gramo de sustrato seco inicial (gssi), además la adición de una solución de extracto de levadura que suplementa la fuente de nitrógeno y cofactores. En este trabajo se usó arroz como sustrato para comparar el efecto de dos composiciones de atmósferas, una normal y otra enriquecida con CO₂ (5%). La máxima producción de conidios por gssi se obtuvo con la atmósfera normal (1.14X10⁹ conidios/gssi), mientras que con la presencia de CO₂, la producción de conidios disminuyó hasta 85% (1.8X10⁸ conidios/gssi). Sin embargo, la actividad amilasa se incrementó hasta tres veces (16.58 UI/gssi) con la atmósfera que contenía dicho gas con respecto a la atmósfera normal (5.41 UI/gssi).

Por otro lado, para estudiar el efecto de la humedad y el tamaño de inóculo en la esporulación de *B. bassiana*, **Núñez-Gaona y col. (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 (1X10⁶, 6X10⁶ y 5X10⁷ 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 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.

1.4. Parámetros de calidad.

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 (**Alatorre-Rosas, 2006**). El propósito del control de calidad es el de 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 (**Berlanga-Padilla, 2006**).

1.4.1. Viabilidad.

La viabilidad es la medida de la cantidad de estructuras (conidios) que tengan la capacidad de germinar, expresada en porcentaje. El estándar recomendado para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es de una viabilidad mayor del 80% (**Berlanga-Padilla, 2006**). La viabilidad o proporción de conidios vivos disminuye con el tiempo, esto depende de las condiciones en las cuales son almacenados, esta prueba debe ser realizada 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, diferentes factores nutricionales y factores ambientales como la temperatura, luz y pH afectan la viabilidad, germinación, crecimiento vegetativo y esporulación (**De la Torre, 2006**).

Las formulaciones a base de 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 y col., 2010**). Sin embargo, es posible que la edad y condiciones del inóculo usados para almacenar, puedan contribuir en la viabilidad y estabilidad morfológica en periodos largos (**Borman y col., 2006**).

1.4.2. Germinación.

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 y col., 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 aislamientos 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.

1.4.3. 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 y col., 2010**). En el caso de los conidios, la hidrofobicidad es el producto de una capa sobre la superficie muy bien organizada de estructuras proteicas en forma de varillas (rodlets) (**Kim y col., 2010**). Las principales proteínas que constituyen los “rodlets” son las hidrofobinas.

1.5. Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

Como se ha mencionado, en CSS se usan materiales como texturizantes que pueden favorecer la obtención de biomasa, conidios o metabolitos de interés (**Robles-Martínez y col., 2008, Nuñez-Gaona y col., 2010; Kang y col., 2005**). Dentro del presente trabajo, se propuso al lirio acuático como texturizante en CSS para obtener conidios de HE. A continuación se describen algunas características de esta planta. El lirio acuático (Figura 1.5) es una planta libre flotadora miembro de la familia de las *Pontederiaceae*, que ocupa un lugar sobresaliente entre las comunidades de hidrófitas de agua dulce de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (**Orozco-Segovia y Vázquez-Yañez, 1993**).



Figura 1.5. Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

El lirio acuático es considerado maleza (planta indeseable) por la serie de problemas que acarrea su presencia y, sobre todo, por el crecimiento tan rápido de su población. Tiene diversos efectos perjudiciales, entre los que se pueden mencionar el entorpecimiento de la navegación por ríos y lagunas, la elevación de los índices de evaporación y el impedimento del paso de luz al fondo de los estanques, lo que trae como consecuencia la eliminación de microalgas que son el alimento de crustáceos y peces (**Dagno y col., 2010; Ding y col., 2006; Novelo y Ramos., 1998; Rzedowski y Rzedowski, 2004**).

Entre las características de adaptación más importantes del lirio acuático están: a) su rápida capacidad de reproducción vegetativa; b) la habilidad para regenerarse a partir de pequeñas porciones del talo vegetativo; c) la completa o parcial independencia de la reproducción sexual; d) la morfología del crecimiento, que resulta en el desarrollo de la mayor área posible de tejido fotosintético, con relación al total de la planta y el cual rápidamente ocupa la superficie del agua, y e) la independencia de las condiciones del sustrato y del nivel del agua (**Franceschini y col., 2010; Miranda y Lot, 1999**).

Por lo anterior, el lirio acuático es considerado una de las plantas invasoras, más difíciles de exterminar. Para su eliminación se usan métodos tradicionales como los mecánicos (trituration), químicos o biológicos, que resultan en diversos efectos perjudiciales como: incrementa el azolve, afecta la calidad del agua, agota el oxígeno y modifica los ecosistemas (**Center y Dray, 2010; Jun-Zhi y col., 2010; Miranda y Lot, 1999**). Estos efectos repercuten en un alto costo productivo, social y ambiental, ya que al

triturar 1000 hectáreas de lirio se depositan al cuerpo de agua 420 mil toneladas de desechos orgánicos, equivalentes a descargar 25 mil camiones de volteo de 7 m³ **(Tecnología Especializada en el Medio Ambiente, TEMA)**.

Por otro lado, el lirio acuático tiene algunos usos en los que podemos encontrar su aplicación como fertilizante, forraje **(Rzedowski y Rzedowski, 2004)**, alimento para carpas, en la elaboración de artesanías, en la producción de biogás, para depurar aguas residuales **(Novelo y Ramos, 1998)**, y recientemente la empresa Tecnología Especializada en el Medio Ambiente (TEMA) fabrica fibras de lirio para la atención de derrames y en el reciclaje de sustancias orgánicas o industriales.

1.6. Texturizantes

Los texturizantes son una serie de materiales tales como los residuos orgánicos o soportes inertes que modifican la textura y son utilizados en procesos que presentan un exceso de agua, para mejorar la estructura, evitar la compactación y mejorar el flujo de aire. Dentro de los agentes texturizantes más utilizados se encuentran: paja, residuos de algodón, aserrín, astillas **(Cayuela y col., 2006)**, viruta de madera, residuos de poda (ramas y troncos secos), pasto seco **(Robles-Martínez y col., 2008)**, bagazo de caña **(Nuñez-Gaona y col., 2010)** y espuma de poliestireno **(Kang y col., 2005)**.

2. Antecedentes

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. En este sentido las técnicas para estimar la calidad del material pueden variar dependiendo del tipo de formulación (**Berlanga-Padilla, 2006**). Como se mencionó anteriormente, algunos parámetros de calidad en los conidios producidos pueden ser el porcentaje de germinación, **G** (%); la hidrofobicidad de la superficie de los conidios, **H** (%); el tiempo en aparecer el primer insecto muerto, **t_o** (días); la tasa específica de muerte, **k** (días⁻¹); y el tiempo para alcanzar el 50% de mortalidad, **LT₅₀** (%) (**Tlecuitl-Beristain y col., 2010; Rodríguez-Gómez y col., 2009; Montesinos-Matías y col., 2011**).

Algunos autores han evaluado ciertos parámetros de crecimiento de HE en CSS tales como: la biomasa seca, **X** (mg/cm²); la producción de conidios, **C** (conidios/cm²); el rendimiento de los conidios en relación a la biomasa, **Y_{C/X}** (conidios/mg X); la productividad, **P** (conidios/h) (**Tlecuitl-Beristain y col., 2010**); y la tasa específica de crecimiento, **μ** (1/h) (**Saucedo-Castañeda y col., 1994**).

Hay trabajos de investigación, los cuales reportan el uso de residuos materiales en la producción de conidios de HE, estos materiales texturizantes aumentan la porosidad y por lo tanto favorecer la aireación; **Kang y col. (2005)** reporta 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 el hecho de 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).

En el proceso de composteo, cuando se tratan residuos vegetales con alto contenido de humedad y bajos en lignina y celulosa, se recomienda emplear agentes texturizantes para favorecer la aireación y por lo tanto el buen desarrollo del proceso de composteo. **Robles-Martínez y col. (2008)** utilizaron una mezcla de viruta de madera y lirio acuático seco (*Eichhornia crassipes*) como agente texturizante en diferentes porcentajes (5, 10, 15 y 20%), cada ensayo fue hecho por triplicado y estuvo compuesto de una mezcla que contenía los seis residuos (jitomate, plátano, papaya, naranja, piña y

lechuga) generados en mayor cantidad en la Central de abasto de la Ciudad de México. Los experimentos se llevaron a cabo en celdas de acrílico donde se colocaron 1200 g de residuos más el texturizante. Los resultados mostraron que el elevado contenido de humedad de la mezcla puede ser regulada con materiales texturizantes secos. Estos materiales absorben parte del lixiviado durante las primeras semanas del proceso y se mejora la textura en las pilas evitando con esto la degradación anaerobia.

En un trabajo previo se ha utilizado 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 y col., 2009, resultados no publicados**).

3. Justificación

La técnica preferida para la producción de conidios de HE es el cultivo en soporte sólido **(De la Torre 2006)**. El CSS es un proceso el cual involucra el crecimiento del microorganismo en sustratos sólidos en ausencia (o casi ausencia) de agua libre, sin embargo, los sustratos deben poseer suficiente humedad para soportar el crecimiento y metabolismo del microorganismo **(Pandey 2003)**. Se ha señalado que el CSS ofrece muchas ventajas como: baja inversión, bajos costos de producción, altas productividades, mayor estabilidad de los productos y bajos requerimientos de agua y energía, entre otros **(Ooijkaas y col., 2000)**.

En el presente trabajo se pretende evaluar la producción de conidios por HE en CSS, usando arroz precocido como sustrato y lirio acuático como texturizante, así como evaluar los parámetros de calidad de los conidios.

Algunos materiales que han sido utilizados como texturizantes son: la viruta de madera, residuos de poda (ramas y troncos secos), pasto seco, poliestireno (plástico residual), bagazo de caña **(Robles-Martínez y col., 2008, Nuñez-Gaona y col., 2010; Kang y col., 2005)**, residuos materiales que permiten mejorar la eficiencia del proceso al aumentar la porosidad y por lo tanto favorecer la aireación, por lo anterior, se propone el uso del lirio acuático como texturizante en el presente trabajo.

En México el lirio acuático es uno de los mayores problemas que afecta a los 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, además con máquinas trituradoras que usan para su retiro que en lugar de acabarlos, los 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 o la navegación, 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, la navegación y al mantenimiento apropiado de áreas recreativas **(Navelo y Ramos, 1998; Rzedowski y Rzedowski, 2004)**. Con esto se usaría el lirio acuático, una plaga que prolifera en lagos y lagunas, como un texturizante para elaborar un producto de alto valor agregado.

4. Hipótesis

Los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* CP-OAX e *Isaria fumosorosea* CNRCB1 al ser cultivados en soportes sólidos con arroz como sustrato principal y lirio acuático como texturizante, permitirá incrementar los rendimientos de conidios sin alterar su calidad.

5. Objetivos

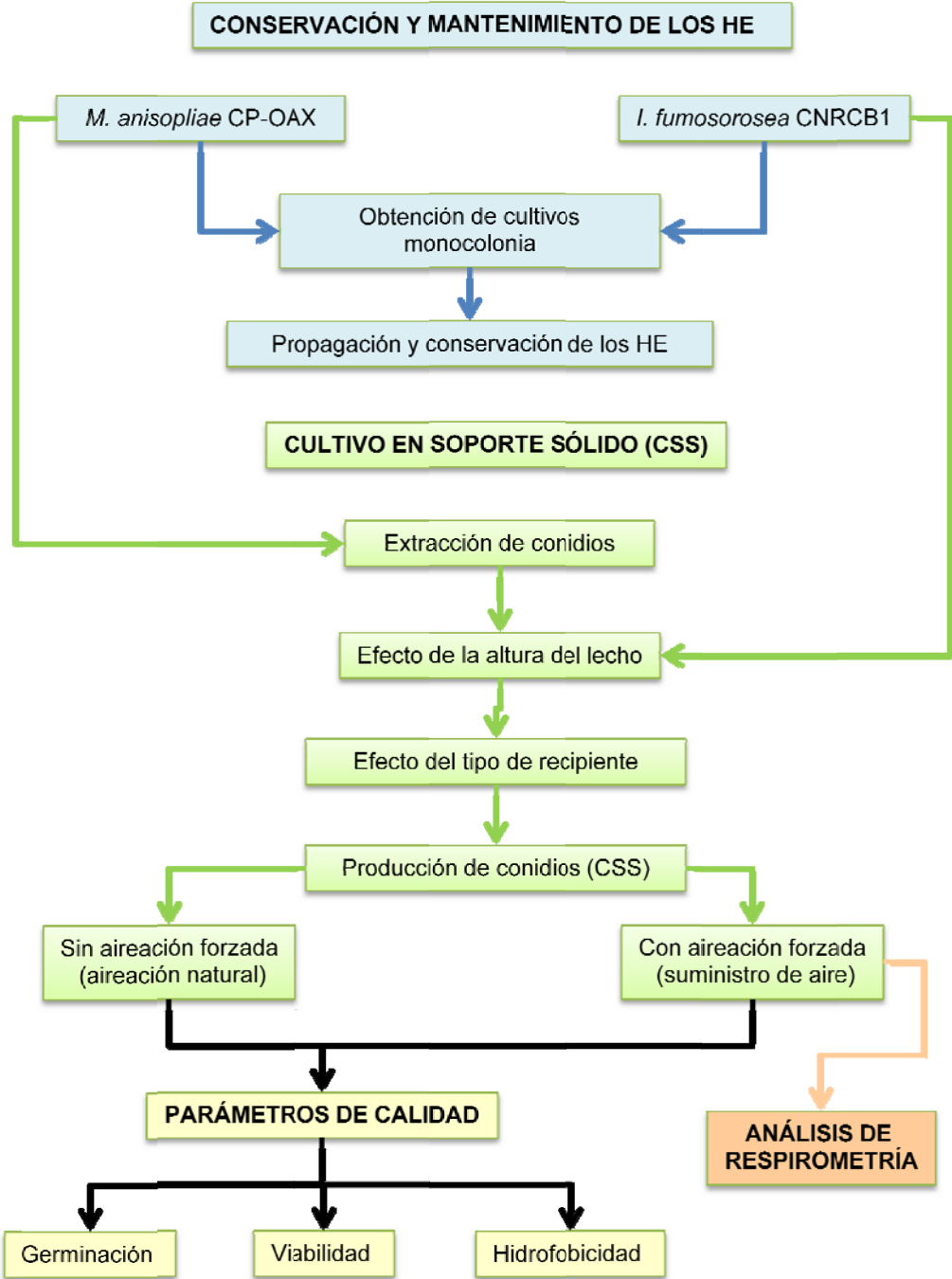
5.1. Objetivo general.

Determinar la producción y calidad de conidios por hongos entomopatógenos en cultivo sólido usando lirio acuático como texturizante y arroz como sustrato.

5.2. Objetivos específicos.

- Determinar el efecto de la altura del lecho y tipo de recipiente en la producción de conidios por HE en CSS.
- Determinar el efecto de la aireación forzada sobre la producción de conidios por HE en CSS.
- Evaluar los parámetros de calidad de los conidios producidos por HE en CSS.

6. Materiales y métodos (diagrama de flujo).



6.1. Obtención de cultivos monoclonia

Se obtuvieron cultivos monoclonia para los hongos *Metarhizium anisopliae* CP-OAX e *Isaria fumosorosea* CNRCB1. Los hongos (por separados) se sembraron por estría en agar maltosa Sabouraud (AMS) al 2% y se incubó a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 7 días. Posteriormente, se tomó una asada de conidios y se sembraron nuevamente por estría en cajas de Petri con medio AMS 2% más desoxicolato de sodio (0.05%) que es un inhibidor de crecimiento de organismos formadores de esporas y facilitó la obtención de colonias aisladas (**Montesinos-Matías, 2008**), de esta siembra se cosecharon colonias libres de contaminación del centro de la caja Petri para propagarlas nuevamente para su conservación.

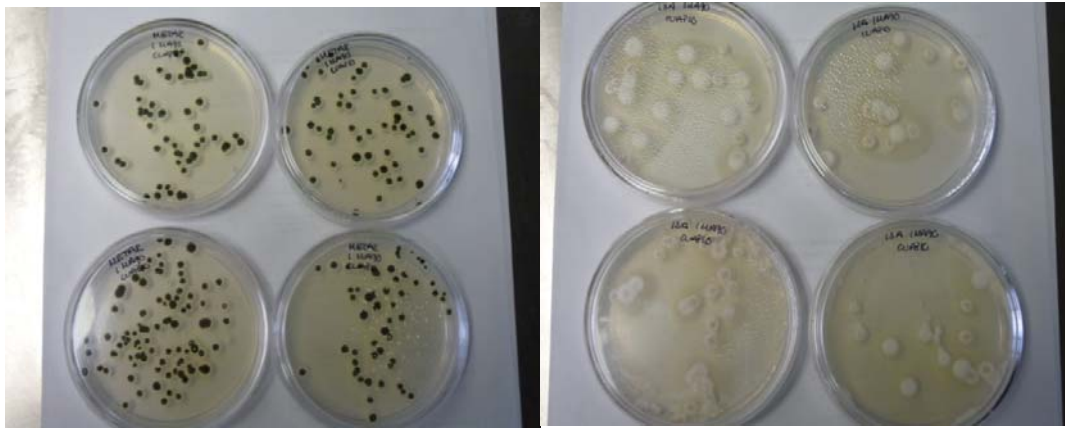


Figura 6.1. Cultivos monoclonia de *I. fumosorosea* CNRCB1 (derecha) y *M. anisopliae* CP-OAX (izquierda).

6.2. Propagación del microorganismo.

Se utilizaron los hongos *Metarhizium anisopliae* CP-OAX e *Isaria fumosorosea* CNRCB1 (Figura 6.2). *M. anisopliae* CP-OAX pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados (COLPOS) en Texcoco, Estado de México, como medio de propagación se utilizó harina de avena con la siguiente composición (g/L): harina de avena 33.3, agar 15 y peptona de carne 10 (**Tlecuitl-Beristain, 2010**), *I. fumosorosea* CNRCB1 proporcionado por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) en Tecomán, Colima, México. Se usó AMS al 2% como medio de esporulación, cuya composición es la siguiente (g/L): maltosa 20, peptona de carne 2.5, peptona de caseína 2.5, extracto de levadura 0.5, agar 15 (**Miranda-Hernández, 2010**); se dosificó 50 mL de medio de cultivo en 3 matraces Erlenmeyer de capacidad de 250 mL además un matraz como control negativo, para ambos hongos y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$

durante 12 días. La identificación de estas cepas se corroboró previamente por secuencia de las regiones ITS, los números de acceso para estas secuencias de ADN son FJ876298 y HM209049, para *M. anisopliae* CP-OAX y para *I. fumosorosea* CNRCB1, respectivamente (Tlecuítl-Beristain, 2010; Miranda-Hernández, 2010).



Figura 6.2. Los HE *I. fumosorosea* CNRCB1 (derecha) y *M. anisopliae* CP-OAX (izquierda).

6.3. Conservación del microorganismo.

El método de conservación (agua desionizada estéril) descrito por López-Lastra y col., 2002 se basó en almacenar (4 °C) viales de vidrio con tapón de rosca con capacidad de 10 mL (Figura 6.3), se esterilizaron conteniendo 4 mL de agua desionizada, en los cuales se colocaron 4 trozos de agar con inóculo (5 mm²) provenientes de un cultivo monoclonia de 7 días de incubación en medio AMS al 2% para *I. fumosorosea* CNRCB1 y en medio harina de avena para *M. anisopliae* CP-OAX. Después se evaluó la viabilidad de los hongos en conservación a los 0, 4 y 6 meses de conservación.

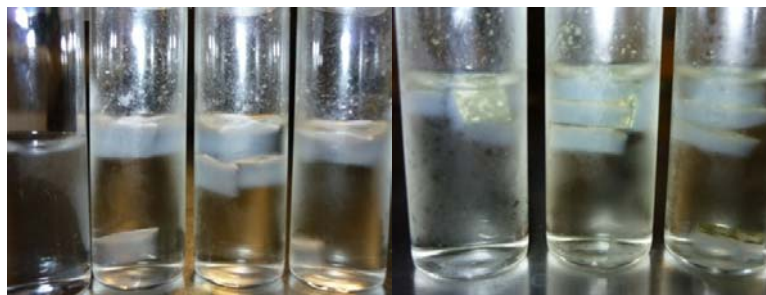


Figura 6.3. Viales de conservación de los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX

6.4. Extracción de conidios.

Se prepararon 18 frascos GERBER® de 80 mL de volumen, con un $\varnothing_i = 5$ cm y $h = 4.7$ cm para 3 tratamientos, cada uno con 5 frascos y su respectivo control negativo. En cada frasco se pesaron 10 g de arroz precocido marca MORELOS® que se esterilizó a 15 PSI durante 15 minutos. El medio se inoculó con 1 mL de una suspensión de conidios conteniendo 1×10^7 conidios/mL (inóculo inicial de 1×10^6 conidios/gssi) y se adicionó la cantidad de agua necesaria para tener 40% de humedad inicial (Raimbult, 1998). Después de inocular el medio se mezcló con una espátula y los frascos se cubrieron con papel aluminio y se colocaron dentro de un desecador con las válvulas abiertas de entrada y salida y se incubó a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 días (Figura 6.4). Para este estudio el inóculo del hongo *M. anisopliae* CP-OAX fue producido en el medio harina de avena descrito en la sección 6.2, incubando durante 6 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

En el sexto día se realizó la extracción de conidios usando Tween 80 al 0.05 % con los siguientes tres tratamientos: a) 30 mL, b) 60 mL y c) dos extracciones con 30 mL; con una espátula se sacó la materia fermentada y se colocó en un vaso de precipitados, se adicionó el volumen de Tween 80 al 0.05% y con un agitador magnético se agitó durante 10 minutos, después se filtró con una gasa para eliminar los sólidos y se obtuvo una suspensión de conidios (SC), entonces se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer (Marienfield), con un microscopio (BOECO) y se usó el objetivo 40X. El rendimiento de conidios se reportó en conidios por gramo de soporte seco inicial (conidios/gssi).



Figura 6.4. Desecador de plástico para cultivo de HE.

6.5. Efecto de la altura del lecho sobre la producción de conidios.

Se utilizaron dos cantidades de arroz que fueron 10 g y 20 g, que generan una altura del lecho dentro de los frascos de 0.5 cm y 1 cm, respectivamente. Los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX se sembraron en los medios correspondientes y descritos en la sección 6.2 durante 12 días a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, para cada hongo se prepararon 10 frascos GERBER® (5 frascos con 10 g y 5 frascos con 20 g de arroz precocido marca MORELOS®), que se inocularon con 1 mL de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^7 con/mL, además se prepararon 3 frascos como control negativo con la cantidad de sustrato (10 g o 20 g) correspondiente y agua destilada estéril (Figura 6.5). Las condiciones de esterilización, inoculación, mezclado, tiempo y temperatura de incubación fueron las mismas y descritas en la sección 6.5, para cada frasco en el día 7 del cultivo. La materia fermentada se transfirió a un vaso de precipitados, se adicionaron 60 mL de Tween 80 al 0.05% y se agitó durante 10 minutos, después se filtró con una gasa para eliminar los sólidos y así obtener una suspensión de conidios (SC), entonces se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer para determinar el rendimiento de conidios (conidios/gssi).



Figura 6.5. Frascos con arroz precocido (sustrato), 10g (derecha) y 20 g (izquierda).

6.6. Efecto del tipo de recipiente en la producción de conidios.

Se realizaron cinéticas de producción de conidios de 7 días para los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX. Para ello se propagaron los hongos y se utilizaron 30 frascos GERBER® y 30 botellas serológicas por aislado (Tabla 6.6), en donde se introdujeron 10 g de arroz precocido (Figura 6.6), ambas unidades experimentales fueron preparadas como se describe en la sección 6.6, así como también se determinó el conteo de conidios de las muestras extraídas cada 24 horas (por triplicado) para ambos aislados.



Figura 6.6. Unidades experimentales para cultivo con 10 g de sustrato, frasco (derecha) y botella serológica (izquierda).

Tabla 6.6. Dimensiones de los recipientes utilizados en CSS.

Recipiente	V (mL)	Ec (cm)	\varnothing_i (cm)	$\varnothing_{boquilla}$ (cm)	h(cm)	Al (cm)
Botella serológica	125	8.3	4.5	1.2	9	0.7
Frasco GERBER®	80	3.7	5	4.2	4.2	0.5

6.7. Producción de conidios sin aireación forzada (aireación natural).

Para la producción de conidios sin aireación forzada se propusieron dos tratamientos: a) arroz (100%) y b) una mezcla de arroz (90%) + lirio (10%). Se realizaron cinéticas de 7 días para ambos aislados de HE, utilizando 30 frascos GERBER® (por aislado), cada uno con 10 g de sustrato sólido, preparados en las condiciones descritas anteriormente (Figura 6.7). Los frascos fueron tapados con papel aluminio y colocados en un desecador con las válvulas abiertas de entrada y salida he incubados por 7 días a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, teniendo 3 réplicas por día más 3 controles negativos para cada tratamiento. Se realizó el conteo de conidios para determinar los rendimientos. En el anexo 11.1 se mencionan las características del lirio acuático utilizado en ésta investigación.



Figura 6.7. Unidades experimentales con 10 g de sustrato, arroz (100%) a la izquierda y arroz-lirio (90%-10%) a la derecha.

6.8. Producción de conidios con aireación forzada (suministro de aire) y análisis de respirometría.

Se preparó el material descrito en el apartado anterior para ambos aislados. Para determinar la tasa máxima específica de producción de CO_2 (μ_{CO_2}) y la fase lag de forma indirecta a partir de la producción de CO_2 se utilizó la metodología descrita por **Saucedo-Castañeda y col., (1994)**, se usó un metabolimetro en donde fueron conectados los reactores de charolas con las siguientes dimensiones: 26.6 cm x 11.5 cm x 20 cm, en la entrada se hizo pasar una corriente constante de aire húmedo con un flujo de 100 mL/minuto (cálculos en el anexo 11.2) y a la salida se conectó a unas trampas de silica gel para retener la humedad y finalmente se conectaron al metabolimetro (Figura 6.8). Se obtuvieron lecturas en línea de CO_2 para determinar la tasa máxima específica de producción de CO_2 (μ_{CO_2}), estimada como producción de CO_2 , así como la fase lag en cada cultivo.



Figura 6.8. Reactores de charolas conectados en línea al metabolimetro.

6.9. Parámetros de calidad.

Las pruebas de calidad se determinaron usando los conidios cosechados en el día de mayor rendimiento; día 6 y 7, para *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1, respectivamente. Para las tres pruebas se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente hasta obtener la SC. En cada ensayo se describe el procedimiento a seguir.

6.9.1. Hidrofobicidad.

Se utilizó el ensayo modificado de exclusión de fases utilizando n-hexadecano como solvente orgánico (**Shah y col., 2007**). Se realizó la extracción de conidios como se describió anteriormente para obtener la SC, que fue centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se desechó el sobrenadante y se efectuaron dos lavados con agua destilada por centrifugación, finalmente se realizó una tercera centrifugación con nitrato de potasio (0.1 M) para neutralizar la carga de la superficie de los conidios. Se estandarizaron las suspensiones de conidios a una concentración final de 1×10^7 conidios/mL. En tubos de ensayo de 10 mL se agregó 1 mL de n-hexadecano y se adicionó 3 mL de la suspensión de conidios, se agitó durante 10 segundos y se dejó reposar por 30 minutos para permitir la separación de fases. Finalmente, se recolectó la fase acuosa con una pipeta Pasteur y se registraron los datos de densidad óptica (DO_{ac}) utilizando un espectrofotómetro (Perkin-Elmer) a 660 nm. La densidad óptica total (DO_{total}) se determinó con la suspensión de conidios inicial. La hidrofobicidad relativa se calculó utilizando la siguiente ecuación expresada en porcentaje, la cual describe la relación entre los conidios hidrofóbicos que emigran a la fase orgánica y los que permanecen en la fase acuosa:

$$\text{Hidrofobicidad relativa (\%)} = 100 \left[1 - \left(\frac{DO_{ac}}{DO_{total}} \right) \right]$$

Donde:

DO_{ac} : densidad óptica en la fase acuosa (conidios que pertenecen en la fase acuosa)

DO_{total} : densidad óptica total (conidios totales)

6.9.2. Germinación.

Se prepararon cámaras húmedas (cajas Petri) con papel filtro en el fondo de la caja, después fueron introducidos dos soportes de goma sobre los cuales se acomodó encima un portaobjetos en donde se distribuyeron 400 μ L de una solución agar-agua

estéril (15 g/L) en los extremos. Posteriormente se estandarizaron suspensiones de conidios a una concentración final de 1×10^6 conidios/mL de donde se tomaron 50 μ L y se adicionaron sobre la superficie de agar-agua ya solidificado, además se agregaron 3 mL de agua destilada estéril sobre el papel filtro, después fueron introducidas las cámaras a una incubadora a 28°C durante 14 horas, realizando el conteo al microscopio con objetivo 40X de por lo menos 200 conidios, registrando los conidios germinados y los no germinados. Se consideró un conidio germinado aquel que presentó el tamaño del tubo germinativo mayor al diámetro del conidio (**Samuels y col., 1989**).

6.9.3. Viabilidad.

Se estandarizaron suspensiones a una concentración de 1×10^4 conidios/mL y se adicionaron 30 μ L (aproximadamente 300 conidios) de cada una a cajas Petri con medio AMS al 2% y 0.5 g/L de desoxicolato de sodio (**Montesinos-Matías, 2008; Tlecuil-Beristain, 2010; Miranda-Hernández, 2010**). Las cajas se incubaron a 28 °C y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) a las 72 horas de cultivo. Se determinó, la viabilidad de los hongos conservados después de 4 y 6 meses de conservación tomando un vial de cada hongo, con una espátula estéril se sacó un cubo de agar con inóculo y se sembró en una caja Petri con medio AMS 2% durante 7 días, posteriormente se realizó una cosecha de conidios con Tween 80 al 0.05% y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para realizar el conteo de UFC (**Miranda-Hernández, 2010**).

6.10. Análisis estadístico.

Para la prueba de hidrofobicidad, germinación y viabilidad de los conidios producidos en los medios arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%) se utilizó la prueba de t de Student para comparación de medias, así como también para comparar los rendimientos en el día de mayor producción; utilizando el software NCSS® 2007.

7. Resultados y discusión.

7.1 Obtención de cultivos monoclonia, conservación y viabilidad de los hongos *Isaria fumosorosea* CNRCB1 y *Metarhizium anisopliae* CP-OAX.

Esta técnica se realizó con la finalidad de obtener una colección confiable de los hongos entomopatógenos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX, ya que a pesar de conocer la procedencia de ellos es necesario asegurar la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se consigan como una prioridad para el inicio y durante ésta investigación. En la figura 7.1.1 se muestra una ilustración de los cultivos monoclonia obtenidos para los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX, respectivamente.

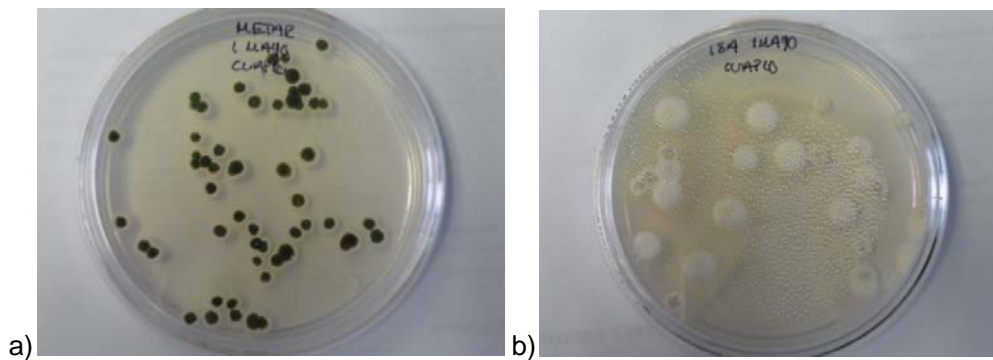


Figura 7.1.1. Cultivos monoclonia; a) *M. anisopliae* CP-OAX, b) *I. fumosorosea* CNRCB1.

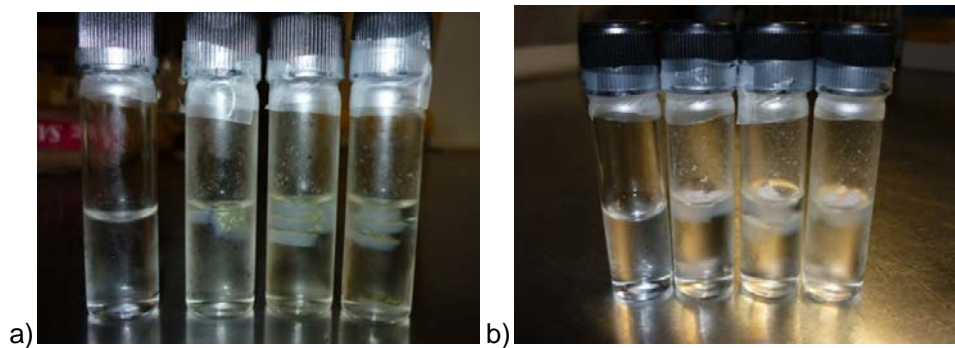


Figura 7.1.2. Conservación en agua desionizada a) *M. anisopliae* CP-OAX, b) *I. fumosorosea* CNRCB1.

Todos los métodos empleados para conservar la vida y las características genéticas de los hongos microscópicos, se basan fundamentalmente en la atenuación o suspensión de su actividad metabólica (**Mier y col., 2005**). El método de conservación empleado en esta investigación se basó en una metodología descrita por **López-Lastra y col. (2002)**, en la figura 7.1.2 se presentan fotografías de los conservados obtenidos para ambos hongos.

Los resultados de la conservación se reportan como el porcentaje de viabilidad, medida como unidades formadoras de colonias (UFC) y se muestran en la tabla 7.1. Estos valores indican que el uso de viales con agua desionizada estéril mantenidos a 4°C, resultó adecuado para *I. fumosorosea* CNRCB1; respecto a *M. anisopliae* CP-OAX se sugiere otro método de conservación como liofilización, glicerol y agua mineral entre otros, debido a que a los 6 meses de conservación la viabilidad disminuyó a un porcentaje menor del 50%.

Tabla 7.1. Porcentajes de viabilidad de los HE conservados.

Hongo	V (%)	Meses
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	90 ± 3.6	4
	81 ± 2.2	6
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	50 ± 1.1	4
	43 ± 3.7	6

Mier y col. (2005) reportaron con este método que los hongos mostraron la conservación de la viabilidad y características morfológicas durante 3.5 años para *M. anisopliae* y de 4.5 para *I. fumosorosea*, por otro lado, **Miranda-Hernández (2010)**, reportó un porcentaje de viabilidad del 50% para *M. anisopliae* CP-OAX a 6 meses de conservación, mientras que para *I. fumosorosea* CNRCB1 del 70% a 2 meses de conservado, ambos hongos fueron propagados en medio PDA (agar papa dextrosa) ; la diferencia en los porcentajes de viabilidad antes mencionados para *M. anisopliae* CP-OAX, comparados con los obtenidos en este trabajo puede deberse a la composición del medio de cultivo en el que el hongo fue propagado antes de ser conservado (medio harina de avena), ya que los diferentes tipos de nutrientes en el medio dan como resultado una variabilidad en el número de conidios producidos (**Kamp y Bidochka, 2002**).

También está implicado la relación C/N en la diferencia de los porcentajes de viabilidad ya que está asociada a la conidiación y germinación de los conidios producidos por hongos entomopatógenos (Vega y col., 2003), de tal manera que los rendimientos de conidios aumentan cuando los valores de la relación C/N son bajos (Shaukat y col., 2009), así tenemos que se usó el medio harina de avena que tiene una C/N =21 (Tlecuitl-Beristain, 2010) para propagar a *M. anisopliae* CP-OAX antes de la conservación, mientras que el trabajo realizado por Miranda-Hernández (2010) utilizó el medio PDA con una relación C/N =10, lo que indica una vez más el efecto en los diferentes nutrientes en el medio que conllevan a una variabilidad en los rendimientos de conidios (Kamp y Bidochka, 2002).

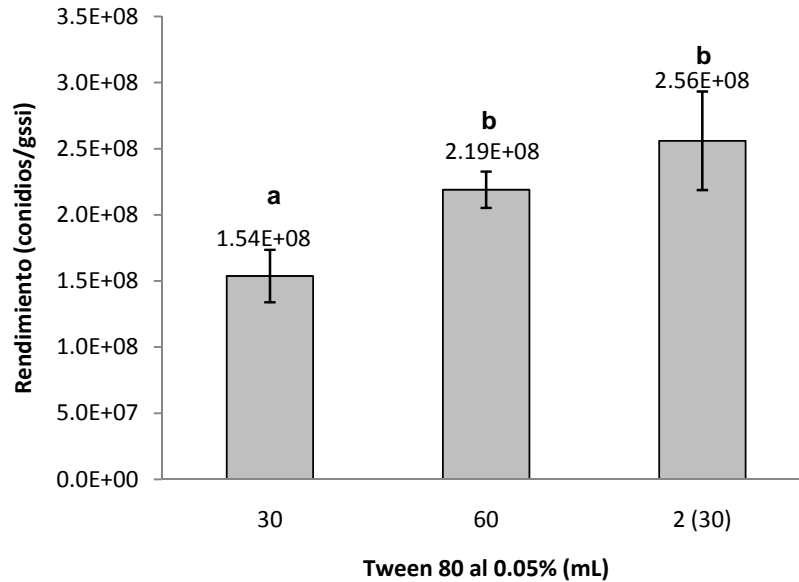
7.2. Extracción de conidios.

Este experimento sólo se realizó para el hongo *M. anisopliae* CP-OAX, se cultivó en arroz precocido marca MORELOS® en las condiciones descritas en la sección 6.5, se realizó la extracción de los conidios en el día de mayor producción (día 6) con Tween 80 al 0.05% ya que es muy utilizado para la extracción de conidios por sus propiedades como surfactante (Robledo-Monterrubio y col., 2009; Rodríguez-Gómez y col., 2009). Garza-López (2008) utilizó 20 mL de Tween 80 al 0.05 % y se agitó durante 10 minutos para extraer los conidios de *B. bassiana* en 5 g de arroz, Miranda-Hernández (2010) usó 20 mL de Tween 80 al 0.05% para extraer conidios de los hongos *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* CNRCB1 y *B. bassiana* cultivados en medio harina de avena.

Debido a que los conidios no siempre son totalmente removidos durante los procesos de extracción, es necesario evaluar su extracción, por lo cual se usaron tres volúmenes distintos de Tween 80 al 0.05% con el objetivo de conocer el volumen de surfactante que permita transferir la mayor cantidad de conidios (provenientes del sustrato) a la fase líquida (Tween 80 al 0.05%). Se consideró como el 100% al tratamiento que permitió mayor extracción de conidios expresado en rendimiento de conidios.

En la gráfica 7.2 se observan los rendimientos de conidios por gramo de soporte seco inicial (conidios/gssi). Cuando se realizó la extracción con 30 mL de Tween 80 al 0.05% se alcanzó una extracción del 60%, sin embargo, cuando se incrementó el

volumen a 60 mL se obtuvo del 85%, por otro lado, se realizó un tratamiento haciendo dos extracciones con 30 mL cada una, se consideró el 100% de extracción.



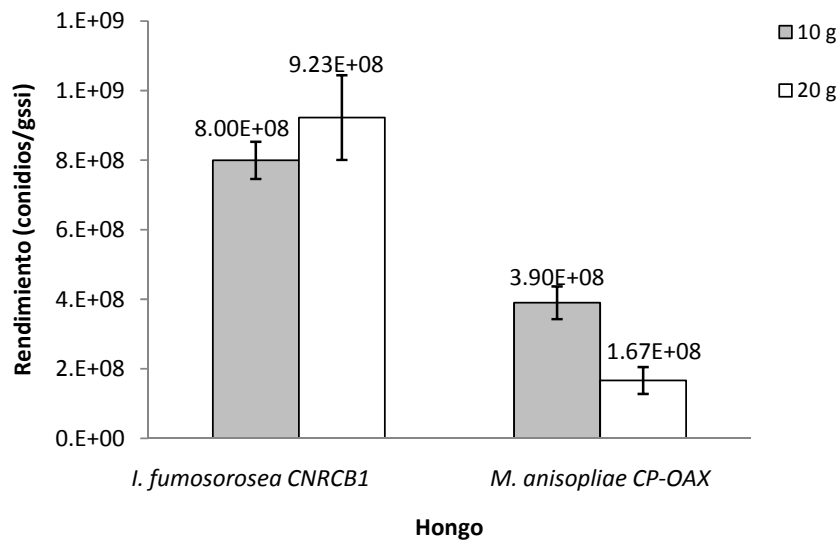
Gráfica 7.2. Rendimientos de conidios para *M. anisopliae* CP-OAX, usando diferentes volúmenes de Tween 80 al 0.05% para la extracción. Las letras distintas indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Los rendimientos alcanzados ponen de manifiesto que utilizando 60 mL de Tween 80 al 0.05% se incrementó la extracción, debido a que las moléculas del disolvente se encuentran en mayor proporción y permitiendo mayor transferencia de conidios (presentes en el sustrato) a la fase líquida por suspensión de los conidios. Por lo tanto, se consideró usar en los siguientes experimentos 60 mL de Tween 80 al 0.05% para realizar la extracción, ya que no hubo diferencia significativa con un $\alpha = 0.05$ en los rendimientos obtenidos en los tratamientos 60 mL y 2x30 mL, además se requiere menor tiempo (10 minutos) para efectuarlo y el porcentaje de extracción es bueno (85%).

7.3. Efecto de la altura del lecho en la producción de conidios.

Este ensayo se llevó a cabo con el propósito de saber cómo se afectan los rendimientos de conidios para los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX al usar dos cantidades diferentes de sustrato (arroz precocido), 10 y 20 g que generó una altura del lecho de 0.5 cm y 1 cm, respectivamente; contenidos en frascos

GERBER® (metodología descrita en la sección 6.6). Considerando el valor promedio del rendimiento, para el caso de *I. fumosorosea* CNRCB1 se presentó un incremento del rendimiento del 16% al emplear 20 g de sustrato (9.23×10^8 conidios/gssi) con respecto a 10 g (8×10^8 conidios/gssi), sin embargo no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en los rendimientos alcanzados para ambos tratamientos. Por otro lado, para *M. anisopliae* CP-OAX el rendimiento obtenido con 10 g de sustrato (3.9×10^8 conidios/gssi) representó un 57% más comparado con 20 g (1.67×10^8 conidios/gssi) y hubo diferencia significativa con un $\alpha = 0.05$ en los rendimientos obtenidos con estos tratamientos (gráfica 7.3).



Gráfica 7.3. Rendimientos de conidios de HE en 10 y 20 g de sustrato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Debido a que el O_2 es necesario en todos los cultivos aerobios, es un factor importante para el crecimiento del microorganismo, por lo que la demanda de O_2 no siempre es la misma durante el cultivo y es recomendable que se mantenga de una forma equitativa a la máxima demanda de O_2 durante la fase de crecimiento acelerado (Sarrfzadeh y Navarro, 2006). El hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 tuvo un crecimiento morfológico muy similar en 10 y 20 g de sustrato (figura 7.3.1), lo que indicó que este hongo es capaz de seguir su proceso de conidiación en mayores cantidades de sustrato (20 g de arroz), sin embargo, una disminución en los espacios del lecho interfiere en el crecimiento y con la transferencia de gases (Dorta y Arcas, 1998; Kang y col., 2005); lo

que nos hace pensar que para los HE *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1, hubo una disminución de la concentración de O₂ con 20 g de arroz, ya que hubo más crecimiento vegetativo y eso causó reducción en los espacios entre los granos de arroz (figura 7.3.2), lo cual conllevó a una menor esporulación y repercutió en los rendimientos de conidios con respecto a 10 g de sustrato, además se ha reportado que conforme se incrementa la altura del lecho los rendimientos de conidios disminuyen (**Dorta y Arcas, 1998; Kang y col., 2005; Nuñez-Gaona y col. 2010; Ye y col., 2006**).

Estos resultados permitieron determinar la cantidad de sustrato que se usó en cinéticas posteriores de producción de conidios y se decidió utilizar 10 g de arroz en los siguientes ensayos para ambos hongos, ya que se obtuvo mayor rendimiento (caso de *M. anisopliae* CP-OAX) y no hay diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) en usar 10 o 20 g de sustrato (caso de *I. fumosorosea* CNRCB1).



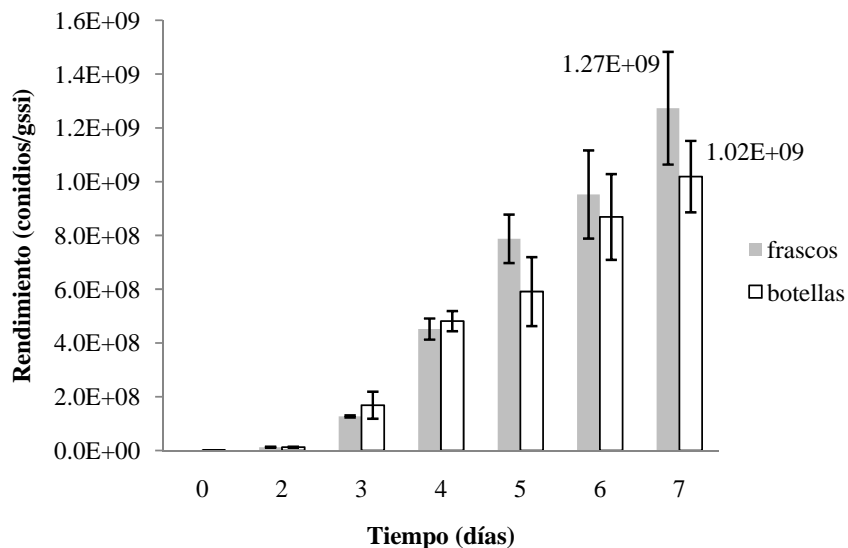
Figura 7.3.1. Crecimiento del hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 en 10 g de arroz (izquierda) y en 20 g de arroz (derecha).



Figura 7.3.2. Crecimiento del hongo *M. anisopliae* CP-OAX en 10 g de arroz (izquierda) y en 20 g de arroz (derecha).

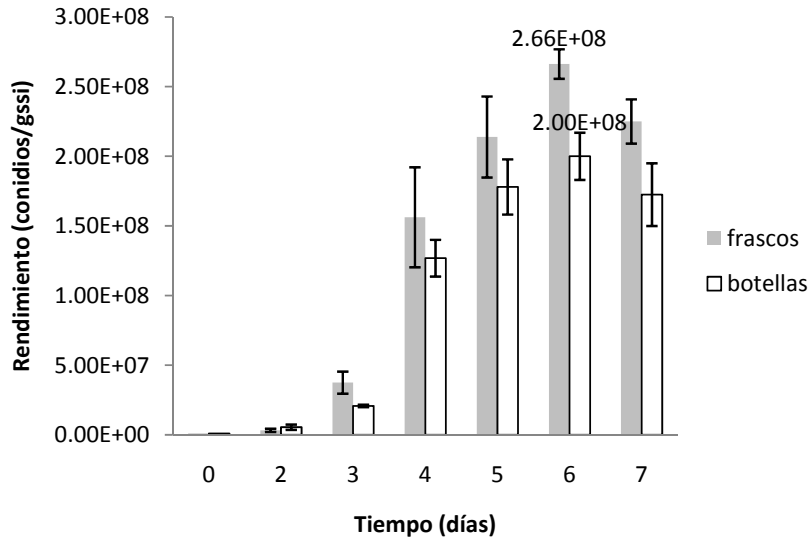
7.4. Efecto del tipo de recipiente en la producción de conidios.

Este trabajo es parte de una línea de investigación más amplia, donde se estudia la influencia de la composición atmosférica en los rendimientos de conidios de HE. En este sentido, se buscan recipientes que permitan analizar (en experimentos posteriores) la concentración de CO₂. Los cultivos se llevaron a cabo sobre 10 g de arroz (mejores rendimientos sección 7.3) y la metodología se describió en la sección 6.7. La gráfica 7.4.1 expone los rendimientos obtenidos por *I. fumosorosea* CNRCB1 con ambas unidades experimentales (frasco GERBER® y botella serológica) durante 7 días de cultivo. Los rendimientos se incrementaron conforme transcurrió el tiempo alcanzando el mayor rendimiento en el día 7 en ambos recipientes; lo que mostró que cuando el cultivo fue llevado a cabo en frascos el valor promedio de los rendimientos de conidios fue de 1.27×10^9 conidios/gssi (20% más) con respecto al obtenido en botellas serológicas (1.02×10^9 conidios/gssi), sin embargo no hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$).



Gráfica 7.4.1. Cinéticas de producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 en CSS con frascos y botellas serológicas. Se especifican los rendimientos en el día 7.

Los rendimientos obtenidos por *M. anisopliae* CP-OAX se aprecian en la gráfica 7.4.2, en donde los mayores rendimientos de conidios se alcanzaron en el día 6 con ambas unidades experimentales, logrando un rendimiento de 2.66×10^8 conidios/gssi (valor promedio) en frascos (25% más), mientras que en botellas se obtuvo un rendimiento de 2×10^8 conidios/gssi y hubo diferencia significativa entre los tratamientos con un $\alpha = 0.05$.



Gráfica 7.4.2. Cinéticas de producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en CSS con frascos y botellas serológicas. Se especifican los rendimientos en el día de mayor producción de conidios (día 6). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Considerando las diferencias significativas en los rendimientos de conidios solo *M. anisopliae* CP-OAX presentó un incremento en los rendimientos de conidios en los días 3, 6 y 7 cuando el cultivo se llevó a cabo en frascos GERBER®, sin embargo, los perfiles de rendimientos obtenidos con frasco fueron más altos que con botella para ambos hongos, lo que nos dio un indicio de que se pueden obtener mejores rendimientos de conidios con este recipiente y puede estar asociado a que los frascos tienen un $\varnothing_i = 5\text{cm}$ (tabla 6.6) generando una altura del lecho menor (0.5 cm) a la ocasionada en la botella serológica (0.7 cm), lo que podría estar reduciendo los espacios en el fondo del recipiente y por consecuencia limitando el flujo de aire, el espacio de cabeza en las botellas podría estar ayudando a no limitar el aire pero su diámetro de boquilla ($\varnothing_{\text{boquilla}} = 1.2\text{ cm}$) no asegura un adecuado intercambio de gases. Kang y col. (2005) mencionan que cuando la

aireación forzada es introducida en un reactor de lecho empacado los rendimientos de conidios se incrementan, porque el suministro del O₂ elimina el CO₂ en el fondo del lecho. Con base en estos resultados, se decidió emplear frascos GERBER® en las siguientes cinéticas de producción de conidios.

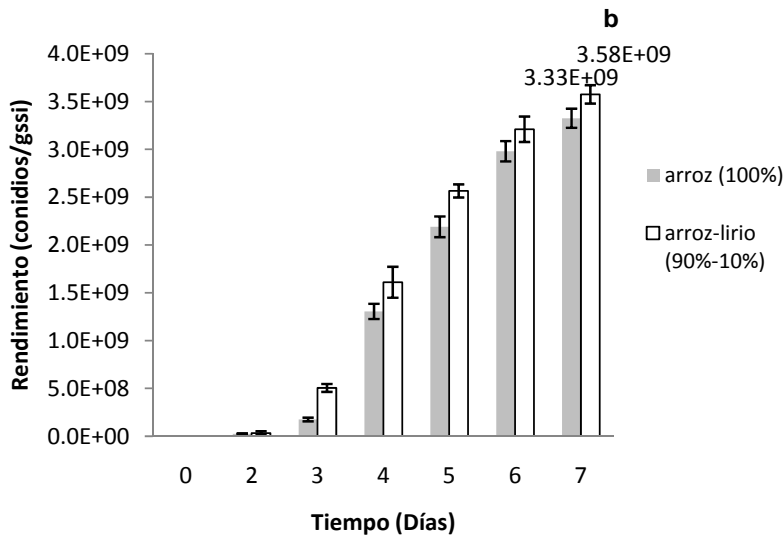
En la tabla 7.4 se enlistan rendimientos de conidios reportados por algunos autores para hongos entomopatógenos tales como *B. bassiana*, *L. lecanii* y *M. anisopliae*, en cultivos llevados a cabo sobre sustratos orgánicos y enriquecidos con fuentes de nitrógeno y sales; en nuestro proceso de CSS sólo se utilizó arroz precocido sin adicionar otra fuente nutricional, cabe señalar que los rendimientos alcanzados en esta investigación se encuentran dentro del rango reportado en bibliografía, sin embargo, algunas diferencias pueden deberse a la especie de hongo entomopatógeno, al tipo de sustrato, los días y condiciones a las cuales se llevo a cabo el cultivo, entre otras.

Tabla 7.4. Comparación de rendimientos de conidios para HE.

Hongo	Sustrato	C (conidios/gssi)	Tiempo de cultivo (días)	Referencia
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	Arroz precocido	2.66X10 ⁸	6	Este trabajo
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	Arroz precocido	1.27X10 ⁹	7	Este trabajo
<i>M. anisopliae</i>	Salvado de arroz	2.3x10 ¹⁰	10	Dorta y col., 1996
<i>B. bassiana</i>	Arroz precocido	1.14X10 ⁹	8	Garza-López y col., 2008
<i>L. lecanii</i>	Arroz precocido	1.5X10 ⁹	9	Feng y col., 2000
<i>L. lecanii</i>	Salvado de arroz	1.4X10 ⁹	9	Feng y col., 2000
<i>B. bassiana</i>	Arroz	2.4X10 ⁹	8	Ye y col., 2006
<i>B. bassiana</i>	Salvado trigo- bagazo caña	1.15X10 ¹⁰	14	Núñez-Gaona y col., 2010
<i>B. bassiana</i>	Residuo papa- bagazo caña	1.07X10 ¹⁰	10	Dalla Santa y col., 2004

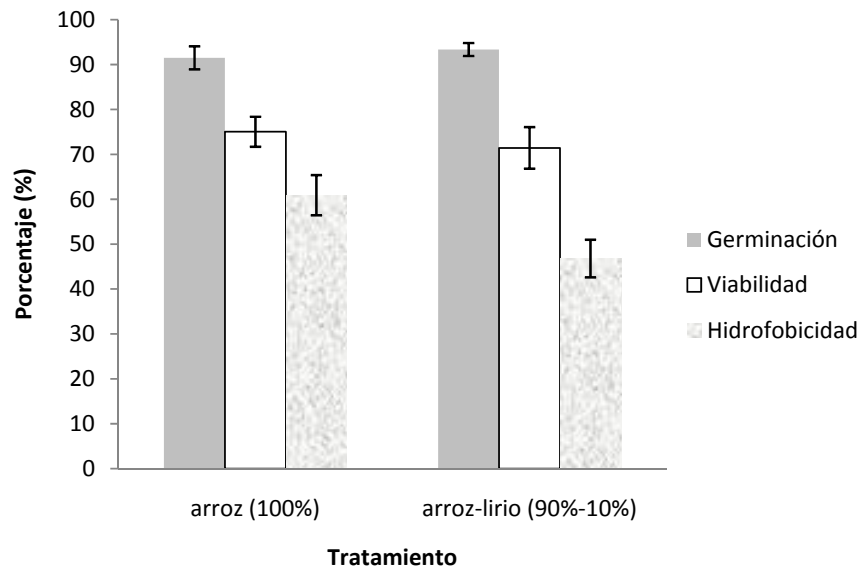
7.5. Producción de conidios sin aireación forzada (aireación natural) y parámetros de calidad.

Los resultados obtenidos en la sección 7.3 y 7.4 nos permitieron pensar en la incorporación de un material que sea usado como texturizante (lirio acuático), que evite la compactación del arroz y permita una mejor aireación. En este sentido, se llevaron a cabo cultivos en frascos GERBER®, con la metodología descrita en la sección 6.8. Los rendimientos de conidios obtenidos para *I. fumosorosea* CNRCB1 se muestran en la gráfica 7.5.1. En la cinética de producción de conidios en arroz (100%) se alcanzó un mayor rendimiento de 3.33×10^9 conidios/gssi, por otro lado, cuando el cultivo se llevó a cabo en una mezcla arroz-lirio (90%-10%) se incrementó el rendimiento de conidios en un 7% (3.58×10^9 conidios/gssi), sin embargo, cuando el rendimiento es expresado solo por gramo de arroz el incremento fue del 17%.



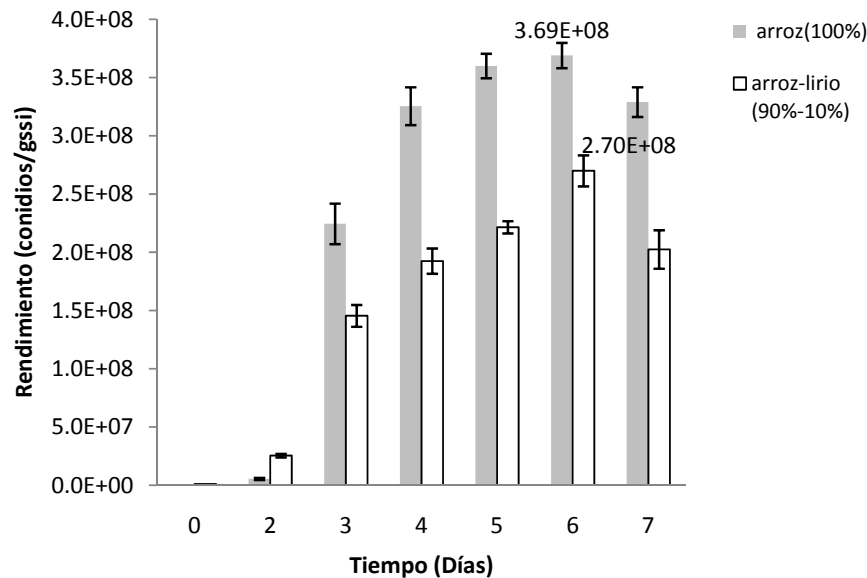
Gráfica 7.5.1. Cinéticas de producción de conidios por *I. fumosorosea* CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%).

En el caso de *I. fumosorosea* CNRCB1, los parámetros de calidad de los conidios cosechados en el día de mayor producción de conidios (día 7) se resumen en la gráfica 7.5.2. Los porcentajes de germinación fueron superiores al 90% en ambos tratamientos y no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05$); en la viabilidad se alcanzó un porcentaje alrededor del 70% sin diferencia significativa ($\alpha = 0.05$), mientras que el porcentaje de hidrofobicidad en arroz fue del 60% y 47% en la mezcla arroz-lirio, lo que representó una disminución de esta variable del 22%.



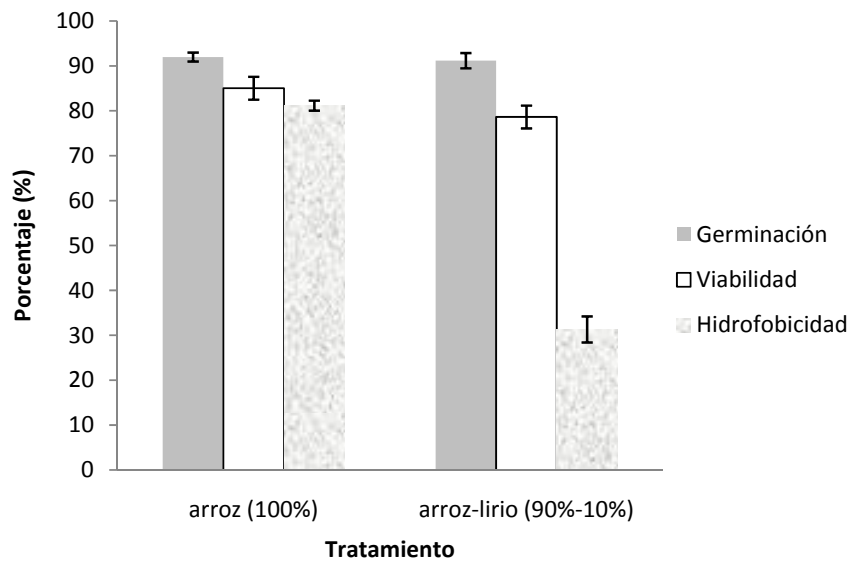
Gráfica 7.5.2. Germinación, hidrofobicidad y viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 determinadas en el día 7. Las letras distintas indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) para cada variable.

En la gráfica 7.5.3. se muestran los rendimientos obtenidos durante 7 días de cultivo para *M. anisopliae* CP-OAX. El mayor rendimiento se presentó en el día 6 (3.69×10^8 conidios/gssi) al emplear solo arroz, mientras que cuando se adicionó lirio acuático éste disminuyó en un 27% (2.70×10^8 conidios/gssi), si el rendimiento es expresado solo por gramo de arroz la disminución representa un 19% (3×10^8 conidios/gssi).



Gráfica 7.5.3. Cinética de producción de conidios por *M. anisopliae* CP-OAX en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Se especifican los rendimientos en el día de mayor producción (día 6). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Los parámetros de calidad de conidios como la germinación, la viabilidad y la hidrofobicidad (gráfica 7.5.4), se determinaron en el día de mayor producción de conidios (día 6) para ambos tratamientos (arroz 100% y arroz-lirio 90%-10%), obteniendo un porcentaje de germinación alrededor del 90% y no hubo diferencia significativa ($\alpha =0.05$) entre los tratamientos. El porcentaje de viabilidad fue del 85% para arroz y 79 % para arroz-lirio lo que indica una disminución del 8% cuando se incorpora el lirio; similarmente la hidrofobicidad fue del 81% para arroz y 31% para arroz-lirio disminuyendo este parámetro en un 61%, para estas dos últimas pruebas hubo diferencia significativa con un $\alpha =0.05$.



Gráfica 7.5.4. Germinación, hidrofobicidad y viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX determinadas en el día 6. Las letras distintas indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) para cada variable.

Se han utilizado otros materiales como texturizantes (viruta de madera, pasto seco, polipropileno y bagazo de caña entre otros), en una investigación que realizó **Núñez-Gaona y col. (2010)** se estudió la esporulación de *B. bassiana* y se usó salvado de trigo como fuente de carbono y bagazo de caña (texturizante) en diferentes proporciones (% peso/peso): 100/0, 70/30, 50/50, 30/70. Se alcanzó un rendimiento máximo de 1.15×10^{10} conidios/gssi en el CSS usando salvado de trigo, este rendimiento disminuyó en orden de magnitud al incrementar el contenido de bagazo de caña, sin embargo, cuando el rendimiento se expresó por gramo de sustrato no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Esto indica que el hongo creció y esporuló preferentemente sobre salvado de trigo, de manera que el bagazo de caña no representó ser un texturizante adecuado.

Recientemente se utilizó arroz (sustrato) y lirio acuático (texturizante) para la producción de conidios de *B. bassiana* en CSS, se empleó en diferentes proporciones porcentuales: a) arroz-lirio (90%-10%), se obtuvo un rendimiento del 116% más (2.25×10^9 conidios/gssi) con respecto al arroz como único sustrato (1.04×10^9 conidios/gssi) y b) arroz-lirio (50%-50%) se alcanzó un rendimiento de 9.83×10^8 conidios/gssi, en el cual no hubo diferencia significativa con respecto al obtenido con

arroz (**Montesinos-Matías y col., 2009, resultados no publicados**). Es importante mencionar que estos cultivos fueron enriquecidos con 0.5 g/L de extracto de levadura y no se realizaron pruebas de calidad de los conidios (H, V y G).

En esta investigación el uso del lirio acuático (texturizante) tuvo un efecto diferente entre los HE estudiados; para *I. fumosorosea* CNRCB1 tuvo un resultado positivo en los rendimientos (17%) ya que este hongo creció y esporuló preferencialmente sobre una mezcla de arroz-lirio, así la incorporación del lirio acuático como texturizante permitió mejorar el proceso al aumentar la porosidad y por lo tanto se favoreció la aireación, evitando la compactación del arroz y proporcionando espacio suficiente para el suministro de O₂, incrementando finalmente el área de contacto (**Arzumanov y col., 2005**). Se ha demostrado que cuando se incrementa la altura del lecho en un reactor de lecho empacado la producción de conidios disminuye (**Dorta y Arcas, 1998**), debido a que la aireación está limitada y afecta el crecimiento del hongo, sin embargo, cuando otro soporte es incorporado al cultivo se disminuyen los problemas de transferencia de O₂ (**Dorta y Arcas, 1998; Kang y col., 2005**).

Por otro lado, para *M. anisopliae* CP-OAX la presencia del lirio acuático como texturizante tuvo un efecto negativo, ya que disminuyó los rendimientos de conidios (2.7×10^8 conidios/gssi) en donde se obtuvo 27% menos con respecto al cultivo llevado a cabo en arroz con un rendimiento de conidios de 3.69×10^8 conidios/gssi. Una posible explicación es la altura del lecho del cultivo de 1.2 cm utilizando 10 g de la mezcla arroz-lirio que es mayor a la obtenida con arroz (0.5 cm) y con base en los resultados obtenidos en la sección 7.3, los rendimientos de conidios disminuyen con una altura del lecho de 1 cm; además en un análisis cualitativo en el crecimiento (figura 7.5) de este hongo sobre la mezcla arroz-lirio, indicó que *M. anisopliae* CP-OAX creció sobre los granos de arroz y no sobre el lirio, posiblemente a que no produce enzimas como hemicelulasas y celulasas que hidrolizan la celulosa y hemicelulosa que se encuentran alrededor del 40% en el lirio acuático que se usó en esta investigación, de tal manera solo pudo hidrolizar el almidón presente en el arroz (80-90%); a diferencia del hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 que invadió los granos de arroz y el lirio (figura 7.5).

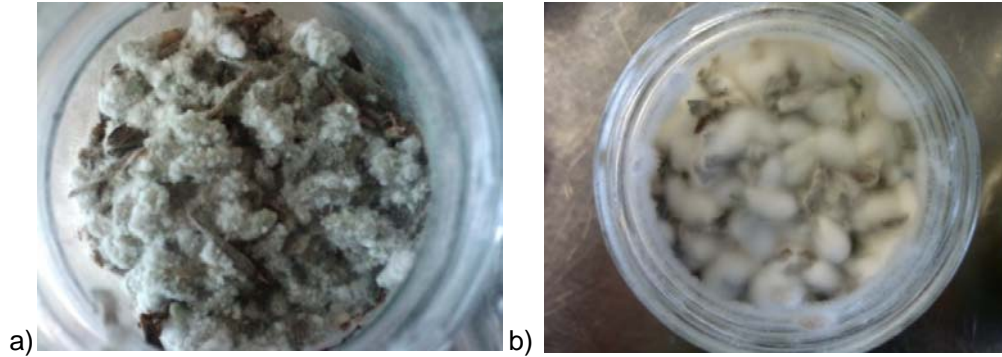


Figura 7.5. Crecimiento de los HE sobre una mezcla de arroz-lirio (90%-10%), a) *M. anisopliae* CP-OAX y b) *I. fumosorosea* CNRCB1. Fotografía tomada en el día de mayor producción de conidios 6 y 7, respectivamente.

Haciendo un análisis de los rendimientos de conidios obtenidos para cada hongo entomopatógeno (tabla 7.5), si se calcula el rendimiento por gramo de arroz vemos que para *I. fumosorosea* CNRCB1 se obtienen más conidios (3.97×10^9 conidios/gssi) en la mezcla arroz-lirio (90%-10%). Es importante resaltar que bajo estas condiciones se utilizó menos cantidad de sustrato (9 g de arroz) y, debido a los valores de germinación (%), se logró obtener más conidios vivos por gramo de sustrato sólido inicial (3.69×10^9 conidios vivos/gssi), en comparación al uso de arroz como único sustrato. Por otro lado, para *M. anisopliae* CP-OAX cuando se cultivó en el medio arroz-lirio se obtuvo un menor rendimiento de conidios por gramo de arroz (3×10^8 conidios/gssi), y menos conidios vivos (2.73×10^8 conidios vivos/gssi) con respecto a los obtenidos con arroz.

Tabla 7.5. Resumen de rendimientos de conidios para ambos hongos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Hongo	Tratamiento	Rendimiento total (conidios/gssi)	Rendimiento por gramo de arroz (conidios/gssi)	G (%)	Conidios vivos/gssi
<i>I. fumosorosea</i> CNRCB1	Arroz (100%)	$3.33 \times 10^9 \pm 9.99 \times 10^7$ A	$3.33 \times 10^9 \pm 9.99 \times 10^7$ A	91.52 ± 2.57 A	3.03×10^9
	Arroz-Lirio (90%-10%)	$3.58 \times 10^9 \pm 9.64 \times 10^7$ B	$3.97 \times 10^9 \pm 1.07 \times 10^8$ B	93.37 ± 1.44 A	3.69×10^9
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	Arroz (100%)	$3.69 \times 10^8 \pm 1.08 \times 10^7$ a	$3.69 \times 10^8 \pm 1.08 \times 10^7$ a	91.98 ± 1.00 a	3.35×10^8
	Arroz-Lirio (90%-10%)	$2.70 \times 10^8 \pm 1.33 \times 10^7$ b	$3 \times 10^8 \pm 1.48 \times 10^7$ b	91.18 ± 1.70 a	2.73×10^8

Para el control de calidad de los HE se llevan a cabo pruebas como la hidrofobicidad, germinación y viabilidad, estas técnicas se realizan sobre los conidios que serán aplicados en campo (**Berlanga-Padilla, 2006**). Estos parámetros fueron determinados en esta investigación para conocer cómo se afectan al incorporar un texturizante (lirio acuático) en el cultivo. Como se puede observar en la gráfica 7.5.2 para *I. fumosorosea* CNRCB1, sólo el porcentaje de hidrofobicidad se disminuyó con la presencia del lirio acuático, los parámetros de G y V no se afectaron. Sin embargo, para *M. anisopliae* CP-OAX se redujeron los porcentajes de H y V.

La hidrofobicidad es un factor muy importante que debe ser considerado en la formulación de un bioinsecticida, ya que de esto depende que los conidios de los HE se adhieran a la cutícula de los insectos (**Le-Tian y col., 2010**). La adhesión de los conidios a los hospederos se puede dar en dos etapas. Durante la primera participan las propiedades físico-químicas de la superficie de los conidios (como la hidrofobicidad y las fuerzas electrostáticas), en la segunda, se secretan enzimas y mucílago que consolidan el ataque y establecen la infección (**Shah y col., 2007**).

Ambos hongos estudiados presentaron un efecto similar con la presencia de lirio acuático, una disminución en el porcentaje de hidrofobicidad, Este efecto pudo deberse a la composición del lirio acuático, ya que se ha demostrado que los nutrientes del medio de cultivo están relacionados con la hidrofobicidad de los conidios, reportando que el tipo de sustrato está correlacionado con la hidrofobicidad (**Boucias y Pendland, 1998; Kim y col., 2010; Rodríguez-Gómez y col., 2009**).

7.6. Producción de conidios con aireación forzada (suministro de aire), parámetros de calidad y análisis de respirometría.

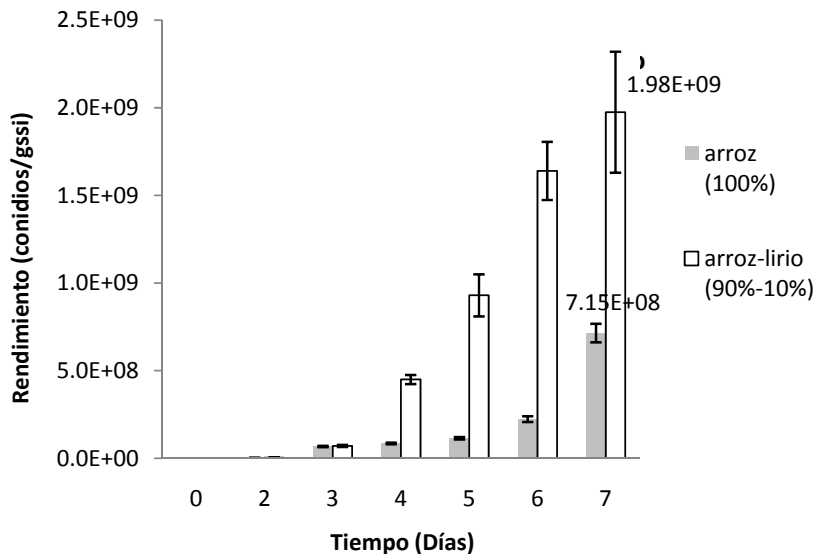
Los resultados obtenidos en ésta sección para ambos hongos, se muestran en dos partes y en el siguiente orden: sección 7.6.1 a) Cinéticas de producción de conidios con aireación forzada, b) Comparación de los rendimientos obtenidos con y sin aireación forzada; c) Parámetros de calidad de conidios con aireación forzada; y sección 7.6.2 Estudios de respirometría (solo para *I. fumosorosea* CNRCB1).

7.6.1. Producción de conidios en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%)

La aireación es uno de los factores críticos que intervienen en la productividad de cultivos llevados a cabo sobre soportes sólidos, debido a que el suministro de aire disminuye el calor metabólico, productos gaseosos y volátiles de la masa fermentada

(Saucedo-Castañeda y col., 1994). Además el O₂ es necesario en todos los cultivos aerobios e influye directamente en el crecimiento y esporulación (Sarrafzadeh y Navarro, 2006), y es conocido que los HE pueden llevar a cabo con éxito estos procesos con aireación forzada en cultivos en pequeña escala (Jenkis y col., 1998), en cultivo sólido se recomienda para mantener las condiciones de aireación, eliminar el CO₂, para regular la temperatura en el sustrato y para regular los niveles de humedad (Rimbault, 1998).

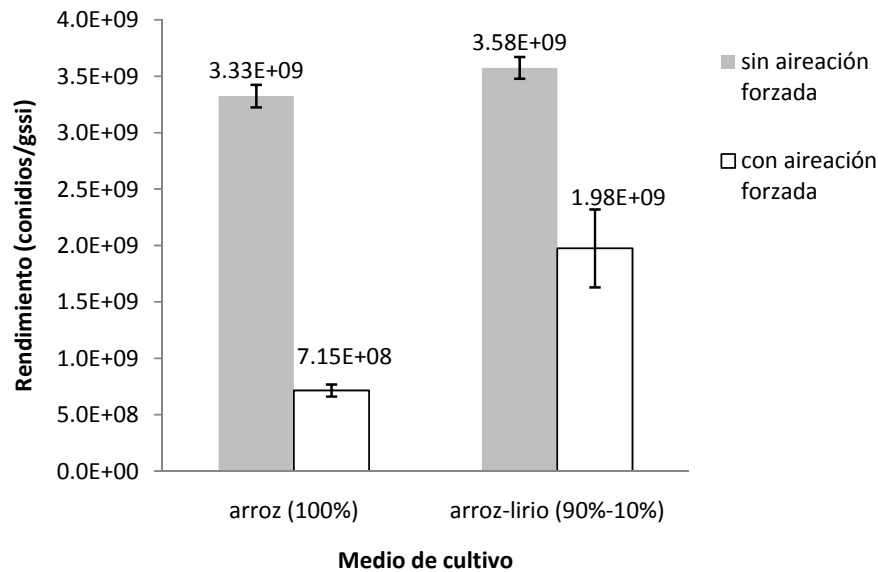
Con base en los resultados mostrados en las secciones 7.3, 7.4 y 7.5 surgió el interés por determinar los rendimientos de conidios con aireación forzada constante durante el tiempo de cultivo (7 días), así como determinar la tasa máxima específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) y fase lag de los hongos *I. fumosorosea* CNRCB1 y *M. anisopliae* CP-OAX (metodología descrita en la sección 6.9) cuando crecen sobre arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Las cinéticas de producción de conidios con aireación forzada se muestran en la gráfica 7.6.1.1 para *I. fumosorosea* CNRCB1, los rendimientos de conidios fueron incrementando en el transcurso del tiempo (7 días de cultivo) logrando un rendimiento de 1.98×10^9 conidios/gssi en la mezcla arroz-lirio que fue 64% mayor al obtenido en arroz de 7.15×10^8 conidios/gssi, lo que marco una diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos.



Gráfica 7.6.1.1. Cinéticas de producción de conidios con aireación forzada por *I. fumosorosea* CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

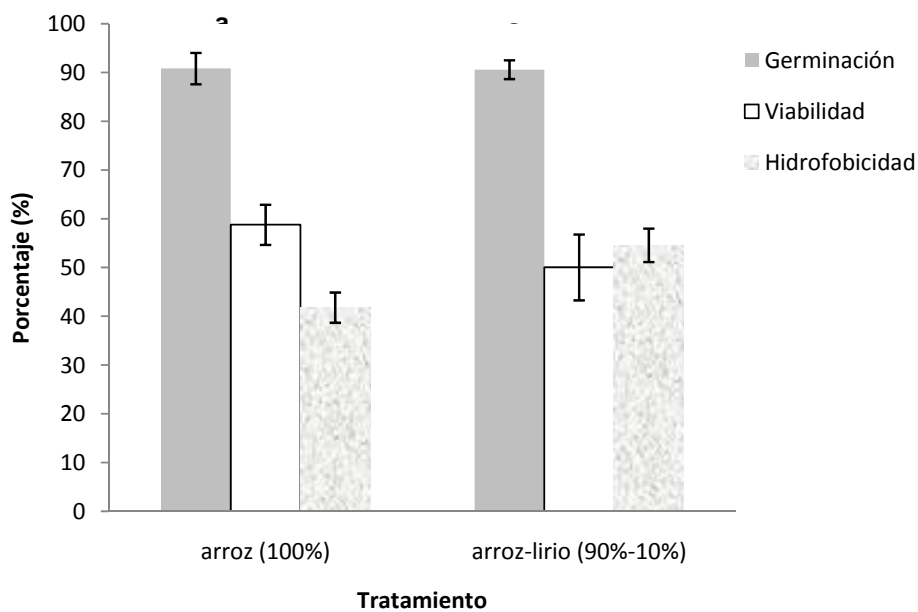
La gráfica 7.6.1.2 resume los rendimientos de conidios alcanzados en el día 7, con y sin aireación forzada para *I. fumosorosea* CNRCB1, tales valores de rendimientos fueron tomados de los gráficos 7.5.1 y 7.6.1.1.

Cuando el hongo creció sobre arroz y aireación forzada constante el rendimiento de conidios obtenido fue menor (7.15×10^8 conidios/gssi) al alcanzado sin aireación forzada (3.33×10^9 conidios/gssi); por otro lado, un efecto similar se observó cuando se cultivó el hongo sobre la mezcla arroz-lirio ya que se alcanzó un rendimiento menor (1.98×10^9 conidios/gssi) con aireación forzada a diferencia del obtenido sin aireación forzada (3.58×10^9 conidios/gssi). Por otra parte, sin aireación forzada el lirio acuático incrementa los rendimientos de conidios en un 7%, mientras que con aireación forzada constante este efecto se incrementa en un 64%.



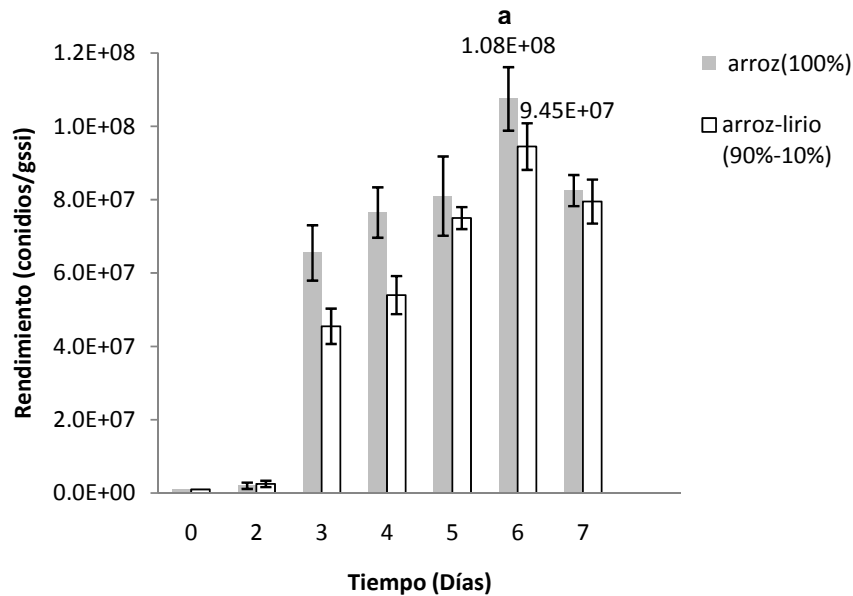
Gráfica 7.6.1.2. Rendimientos de conidios obtenidos con y sin aireación forzada por *I. fumosorosea* CNRCB1 en el día de mayor producción de conidios (día 7), creciendo sobre arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

El efecto de la aireación forzada en los parámetros de calidad para *I. fumosorosea* CNRCB1 se muestran en la gráfica 7.6.1.3. En este caso, se obtuvo un porcentaje de germinación cercano al 90% en ambos tratamientos, sin presentar diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) entre ellos. Tampoco se presentaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) en los porcentajes de viabilidad (los cuales oscilan entre 50 y 60%) entre los tratamientos, sin embargo, el porcentaje de hidrofobicidad fue significativamente menor en la mezcla arroz-lirio (41.80%) con respecto al obtenido solo con arroz (54.57%).



Gráfica 7.6.1.3. Parámetros de calidad de los conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 con aireación forzada, cosechados en el día 7. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) para cada variable de calidad.

La gráfica 7.6.1.4 muestra las cinéticas de producción de conidios con aireación forzada para el hongo *M. anisopliae* CP-OAX. Considerando los valores promedio de los rendimientos se presentó un incremento del 4% en el rendimiento (1.08×10^8 conidios/gssi) con arroz en el día 6 (día de mayor producción de conidios), a diferencia del logrado en la mezcla arroz-lirio con un valor de 9.45×10^7 conidios/gssi y no hubo diferencia significativa ($\alpha = 0.05\%$) en los tratamientos.

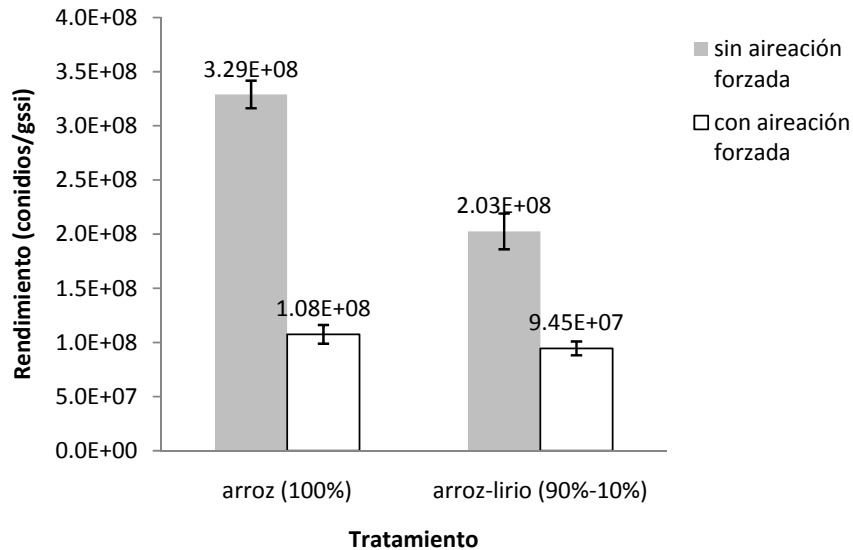


Gráfica 7.6.1.4. Cinéticas de producción de conidios con aireación forzada por *M. anisopliae* CP-OAX en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Se especifican los rendimientos en el día 6. Letras iguales indican que no hubo diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

Los rendimientos de conidios obtenidos en el día de mayor producción (día 6) con y sin aireación forzada para *M. anisopliae* CP-OAX se resumen en la gráfica 7.6.1.5, los valores de rendimientos fueron tomados de las gráficas 7.5.3 y 7.6.1.4.

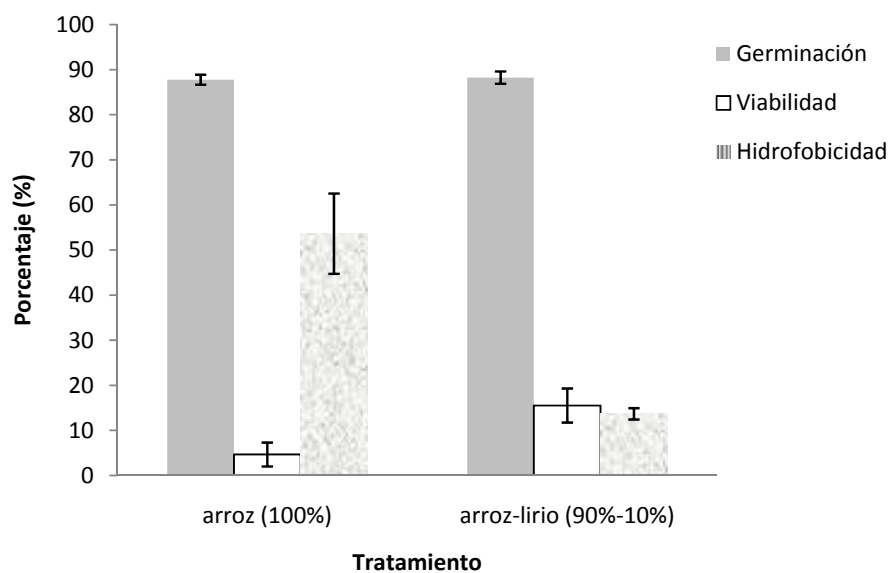
Cuando el hongo creció sobre arroz y aireación forzada se alcanzó un rendimiento menor (1.08×10^8 conidios/gssi) con respecto al logrado sin aireación forzada (3.29×10^8 conidios/gssi). De manera similar, cuando el hongo se cultivó sobre una mezcla de arroz-lirio el rendimiento de conidios obtenido con aireación forzada fue menor (9.45×10^7 conidios/gssi) al conseguido sin aireación forzada (2.03×10^8 conidios/gssi). Por otro lado,

sin aireación forzada el lirio acuático disminuye el rendimiento de conidios en un 38%, mientras que la aireación forzada constante disminuye este efecto en un 12.5%.



Gráfica 7.6.1.5. Rendimientos de conidios obtenidos con y sin aireación forzada por *M. anisopliae* CP-OAX en el día de mayor producción de conidios (día 6), creciendo sobre arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$).

La gráfica 7.6.1.6 muestra los parámetros de calidad de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX cosechados en el día de mayor producción de conidios (día 6) con aireación forzada. El porcentaje de germinación es cercano al 90% en ambos tratamientos. Los porcentajes de viabilidad fueron muy bajos en los tratamientos; 5% para arroz y 16% para la mezcla arroz-lirio. Los porcentajes de hidrofobicidad mostraron diferencia significativa ($\alpha =0.05$) siendo mayor en arroz con un porcentaje del 54%, mientras que el obtenido en arroz-lirio fue del 14%.



Gráfica 7.6.1.6. Parámetros de calidad de los conidios de *M. anisopliae* CP-OAX con aireación forzada, cosechados en el día de mayor producción de conidios (día 6). Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$) para cada variable de calidad.

En esta investigación, el suministro de aireación forzada constante tuvo un efecto perjudicial, afectando directamente los rendimientos y parámetros de calidad de los conidios cosechados en el día de mayor producción para ambos hongos entomopatógenos (día 7 para *I. fumosorosea* CRCB1 y día 6 para *M. anisopliae* CP-OAX), estos resultados coinciden con los reportados por **Arzumanov y col., 2005**, que realizaron cultivos sólidos de *M. anisopliae* var. *acridum* usando una mezcla de arroz/bagazo de caña como sustrato, no recomiendan el uso de aireación forzada ya que los rendimientos se disminuyen, se sugiere el uso de flujos muy bajos o bien no suministrar aireación forzada para asegurar los niveles de esporulación. Por otro lado, nuestros resultados fueron contrarios a los reportados por otros autores como **Kang y col. (2005)** en donde mencionan que cuando la aireación forzada es suministrada en un cultivo de lecho empacado, los rendimientos de conidios incrementan para el hongo *Beauveria bassiana* en cultivo en medio sólido, también **Jenkis y col., 1998** la recomiendan debido a que mejora los rendimientos de conidios en HE y acelera el proceso de conidiación y **Dorta y Arcas 1998**, mejoraron los rendimientos de conidios en *M. anisopliae* en cultivo sólido.

Por otro lado, el incremento en el rendimiento de conidios que presentó el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 con lirio acuático concuerda con otras investigaciones en donde se reporta que la incorporación de otro material en el medio de cultivo, como la espuma de poliuretano (Kang y col., 2005) y lirio acuático (Montesinos-Matías y col., 2009, resultados no publicados), mejoran los rendimientos de conidios. El efecto del lirio fue reproducible con los resultados encontrados cuando los cultivos se llevaron a cabo en la mezcla arroz-lirio pero sin aireación forzada (sección 7.5, gráficas 7.5.1 y 7.5.3), aunque la magnitud de los rendimientos no fue la misma entre los tratamientos con y sin aireación forzada.

Una posible respuesta a los bajos rendimientos obtenidos con aireación forzada es que la aireación puede inducir reacciones metabólicas, ya sea por estrés hídrico, estrés por calor o cambios en la temperatura (Raimbault y col., 1998). Por otro lado, Arzumanov y col., 2005 reportó que durante el proceso de conidiación de *M. anisopliae* var. *acidum* se requiere de una mínima demanda de oxígeno, ya que un exceso de la misma genera un lento crecimiento y por lo tanto una disminución en los rendimientos de conidios. Con base en lo anterior, en los cultivos de los HE *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1 hubo una modificación de la humedad del cultivo a través del tiempo. En las tablas 7.6.1 y 7.6.2 se muestran los valores de humedad medidos en el tiempo inicial y final de las cinéticas para ambos HE, en donde se incrementaron los porcentajes de humedad siendo mayores en el tiempo final (día 7) comparando con los del tiempo inicial (día 0); la modificación de la humedad pudo ser a consecuencia del suministro de aire húmedo a los reactores de charolas y como respuesta los rendimientos disminuyeron; Nuñez-Gaona y col. (2010) mostraron que los rendimientos de conidios disminuyen conforme se incrementa el porcentaje de humedad, utilizando salvado de trigo (sustrato) y bagazo de caña (texturizante) en cultivo sólido para *Beauveria bassiana*.

Tabla 7.6.1. Porcentajes de humedad (%h) y actividad de agua (a_w) de los cultivos sólidos con aireación forzada de *I. fumosorosea* CNRCB1.

Medio de cultivo	$h_{inicial}$ (%)	h_{final} (%)	$a_{winicial}$	a_{wfinal}
Arroz (100%)	41.42±0.26	43.97±0.31	.998	.997
Arroz-Lirio (90%-10%)	38.70±0.14	42.03±0.28	.995	.996

Tabla 7.6.2. Porcentajes de humedad (%h) y actividad de agua (a_w) de los cultivos sólidos con aireación forzada de *M. anisopliae* CP-OAX.

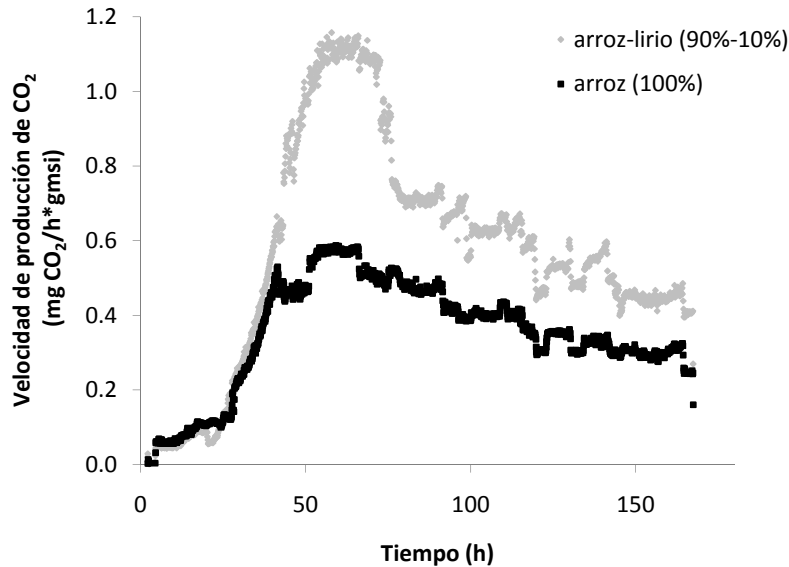
Medio de cultivo	$h_{inicial}$ (%)	h_{final} (%)	$a_{winicial}$	a_{wfinal}
Arroz (100%)	39.03±0.37	42.15±0.15	.997	.996
Arroz-lirio (90%-10%)	37.45±0.16	41.89±0.20	.998	.996

Con base en los valores de a_w medidos en el tiempo inicial y final, hubo una disminución muy ligera de este parámetro al final del cultivo y no es muy distinto al inicial, por lo que no se puede saber que paso durante la cinética, sin embargo, hay reportes que mencionan efectos ocasionados por una disminución de a_w . La reducción de a_w tiene un marcado efecto sobre el crecimiento microbiano. Generalmente, una reducción en a_w aumenta la fase lag de un organismo, disminuye la tasa específica de crecimiento hasta que el crecimiento cesa y genera una baja cantidad de biomasa (**Raimbault y col., 1998**). La a_w óptima para el crecimiento de un número limitado de hongos usados en los procesos de CSS es de 0.96 como mínimo, donde la a_w requerida para el crecimiento mínimo es generalmente más grande que 0.9. El mantenimiento de la a_w para el óptimo crecimiento permite a la biomasa fúngica crecer sin necesidad de esporular. Por otro lado, se ha encontrado en agentes de control biológico que a valores altos de $a_w= 0.96$ hay una rápida germinación en un rango de temperatura de 15 a 35 °C (**Dagno y col., 2010**).

7.6.2 Estudios de respirometría.

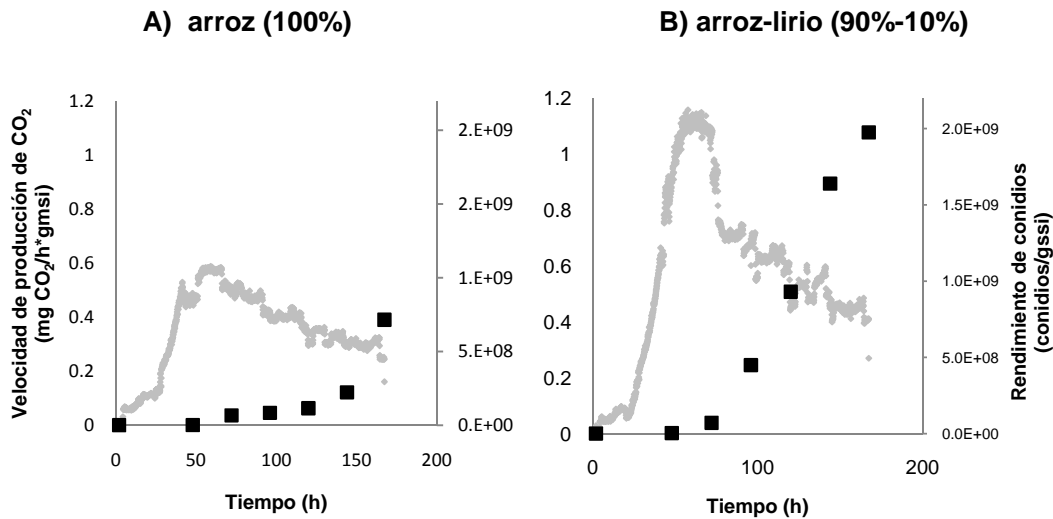
La evolución de CO_2 puede ser usada como una medición indirecta del crecimiento del microorganismo (**Cruz-Córdova y col., 1999; Saucedo-Castañeda y col., 1994**). Desafortunadamente las mediciones de biomasa en línea son todavía difíciles de determinar, a pesar de esto se han desarrollado procesos de monitoreo de CO_2 y de O_2 en los gases de salida, que pueden proporcionarnos una adecuada información sobre el estado fisiológico del CSS (**Saucedo-Castañeda y col., 1994**). Los perfiles de evolución del CO_2 en cultivo sólido para *I. fumosorosea* CNRCB1 mostraron diferencias cuando se utilizó arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%), y se muestran en la gráfica 7.6.2.1. Se alcanzó una máxima velocidad de producción de CO_2 de 1.16 mg

CO₂/h*gmsi a las 57.9 horas del cultivo sobre la mezcla arroz-lirio, mientras que en arroz la máxima velocidad de producción de CO₂ fue de 0.59 mg CO₂/h*gmsi a las 60 horas.



Gráfica 7.6.2.1. Perfiles de velocidad de producción de CO₂ por *I. fumosorosea* CNRCB1 en arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%) durante 7 días de cultivo.

Los resultados de las gráficas 7.6.2.2 A y B, corresponden a los perfiles de velocidad de producción de CO₂ y se muestran junto con la cinética de producción de conidios obtenida con los tratamientos arroz y arroz-lirio en cada caso. En la gráfica 7.6.2.2 A (arroz 100%) se observó que inicialmente la fase de crecimiento acelerado se presenta en las primeras 60 horas del cultivo en donde hay crecimiento vegetativo (producción de micelio) alcanzando una tasa máxima de producción de CO₂ a las 60 horas, después hubo una disminución en la tasa de producción de CO₂ desacelerando paulatinamente hasta las 168 horas del cultivo, sin embargo, los rendimientos de conidios comienzan a incrementar a las 72 horas que corresponde cuando la tasa de producción de CO₂ está desacelerando. Cuando el cultivo se llevó a cabo en arroz-lirio, gráfica 7.6.2.2. B, ocurrió un comportamiento similar con arroz, en las primeras horas se presentó la fase de crecimiento acelerado hasta tener una tasa máxima de producción de CO₂ a las 57.9 horas, después de esa fase la tasa de producción de CO₂ fue disminuyendo.



Gráfica 7.6.2.2. Evolución de CO₂ y rendimiento de conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1; tasa de producción de CO₂ () y rendimiento de conidios ().

La disminución en la tasa de producción de CO₂ puede estar asociada a la diferenciación celular del hongo (conidiación), ya que a partir de las 72 horas se incrementa la conidiación, de hecho los rendimientos de conidios aumentan a través del tiempo conforme se disminuye la velocidad de producción de CO₂; durante la diferenciación celular el hongo deja de formar micelio e inicia la conidiación (**Aguirre y col., 2005**). La mayor tasa de producción de CO₂ obtenida a las 60 horas del cultivo con la mezcla arroz-lirio puede explicarse por una mayor producción de micelio aéreo durante las primeras horas del cultivo. **Rahardjo y col. (2001)** reportan que las hifas aéreas son de gran importancia en la respiración del hongo, debido a que no hay limitación de oxígeno porque la difusividad del oxígeno es suficientemente alta.

En la tabla 7.6.2.1 se resumen los parámetros de crecimiento obtenidos para *I. fumosorosea* CNRCB1 cuando crece sobre arroz y arroz-lirio durante el tiempo de cultivo (7 días), tales parámetros se derivan del análisis de los datos de respirometría (evolución de CO₂ en la gráfica 7.6.2.1) y se explica cómo se obtuvieron en el anexo 11.3.

Tabla 7.6.2.1. Parámetros de crecimiento para *I. fumosorosea* CNRCB1 con aireación forzada.

Medio de cultivo	Tasa de producción de CO ₂ (mg CO ₂ /h*gmsi)	Fase lag (h)	μ _{CO2} (1/h)	Producción total de CO ₂ (mg CO ₂ /gmsi)
arroz (100%)	0.59	20.4	0.081	58.18
arroz-lirio (90%-10%)	1.16	19.9	0.075	93.95

Los valores de μ_{CO2} encontrados en esta investigación son diferentes a los valores reportados por otros autores (tabla 7.6.2.2) para hongos entomopatógenos utilizando el análisis de respirometría para calcular este parámetro, es importante señalar que μ_{CO2} es intrínseca de cada microorganismo y varía dependiendo del sustrato en que crezca.

Tabla 7.6.2.2. Valores de μ_{CO2} para HE en CSS, reportados por otros autores.

Hongo	μ _{CO2} (1/h)	Sustrato	Referencia
<i>B. bassiana</i>	0.07	Glucosa	Rodríguez-Gómez (2009)
<i>B. bassiana</i> 885.2	0.04	Glucosa	Rodríguez-Gómez (2009)
<i>L. lecanii</i>	0.04	Cutícula y sacarosa	Barranco-Florido (2004)

8. Conclusiones.

Con el método de conservación (agua desionizada estéril), se alcanzó una viabilidad del 81% a 6 meses de conservación para el hongo *Isaria fumosorosea* CNRCB1, mientras que para *Metarhizium anisopliae* CP-OAX se sugiere otro método de conservación.

Un incremento en la altura del lecho de 1 cm (20 g de arroz), disminuyó los rendimientos de conidios para los hongos *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1.

La geometría de la botella serológica (\emptyset) disminuyó los rendimientos de conidios para los hongos *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1, debido a que aumentó la altura del lecho.

El lirio acuático puede ser utilizado como texturizante para el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1 sin aireación forzada, puesto que, al mezclarlo con arroz, se obtuvo un mayor rendimiento de conidios, sin alterar los parámetros de calidad de V y G. En contraste a lo anterior, para *M. anisopliae* CP-OAX al incluir el lirio en el medio de cultivo los rendimientos de conidios disminuyen así como los parámetros de calidad H y V.

La aireación forzada constante repercutió negativamente en los rendimientos de conidios, así como en los parámetros de calidad para ambos hongos entomopatógenos *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* CNRCB1.

9. Perspectivas.

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

Probar otros métodos de conservación para *M. anisopliae* CP-OAX, tales como la liofilización, nitrógeno líquido o desecación en cristales de sílice.

Realizar bioensayos para ambos hongos entomopatógenos con su hospedero correspondiente, y determinar los parámetros de virulencia.

Hacer análisis de respirometría para el hongo *M. anisopliae* CP-OAX, con los medios de cultivo arroz (100%) y arroz-lirio (90%-10%).

Realizar cinéticas de producción de conidios con aireación forzada, utilizando un flujo de aire más bajo y sin aire saturado.

10. Referencias.

- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*. 13:111-118.
- Alatorre-Rosas R. 2006. Insecticidas microbianos en el manejo de insectos plaga. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
- Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 40:1037-1042.
- Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G, Saucedo-Castañeda G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:910-915.
- Barranco-Florido JE. 2004. Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* cultivado en medio sólido. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 63-82.
- Berlanga-Padilla A. 2006. Calidad de hongos entomopatógenos. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
- Borman AM, Szekely A, Campbell CK, Johnson EM. 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.
- Boucias DG, Pendland JC. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers. 1-14.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. 2001. Introduction-Fungal biological control agents: progress, problems and potencial. In: TM Butt, Jackson C, Magan N. (Eds). *Fungi as Biocontrol Agents*. CABI Publishing, UK. 1-8.
- Cañedo V, Ames T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa. 1-62.
- Cayuela ML, Sánchez-Montero MA, Roig A. 2006. Evaluation of two different aeration systems for composting two-phase olive mill wastes. *Process Biochemistry*. 41:616-623.
- Center TD, Dray A. 2010. Bottom-up control of water hyacinth weevil populations: do the plants regulate the insects?. *Journal of Applied Ecology*. 47:329-337

- Cruz-Córdova T, Roldan-Carrillo TG, Díaz-Cervantes D, Ortega-López J, Saucedo-Castañeda G, Tomasini-Campocoso A, Rodríguez-Vázquez. 1999. CO₂ evolution and ligninolytic and proteolytic activities of *Phanerochaete chrysosporium* grown in solid state fermentation. *Resources Conservation and Recycling*. 27:3-7.
- Dagno K, Lahlali R, Diorté M, Jijakli MH. 2010. Effect of temperature and water activity on spore germination and mycelial growth of three fungal biocontrol agents against water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Journal of Applied Microbiology*. 110:521–528.
- Dalla Santa HS, Sousa NJ, Brand D, Dalla Santa OR, Pandey A, Sobotka M, Paca J, Soccol CR. 2004. Conidia production of *Beauveria bassiana* sp. by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiologica*. 49(4):418-422.
- De la Torre M. 2006. Producción de hongos entomopatógenos. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima
- Ding J, Reardon R, Wu Y, Zheng H, Fu W. 2006. Biological control of invasive plants through collaboration between China and the United States of America: a perspective. *Biological Invasions*. 8:1439–1450.
- Dorta B, Erlota RJ, Arcas J. 1996. Characterization of growth and sporulation of *M. anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19:434-439.
- Dorta B, Arcas J. 1998. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:501–505.
- Elizalde-Blancas V. 2006. Signos y síntomas causados por hongos entomopatógenos en insectos hospederos. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
- Feng KC, Liu BL, Tzeng TM. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*. 23:25-29.
- Fernández-Rosas F. 2006. Métodos de preservación. Taller: Hongos entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de calidad. Manzanillo Colima.
- Franceschini MC, Poi de Neiff A, Galassi ME. 2010. Is the biomass of water hyacinth lost through herbivory in native areas important?. *Aquatic Botany*. 92:250–256.
- Garza-López P.M. 2008. Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) vuillemin como respuesta a la composición atmosférica. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México.
- Garza-López PM, Konigsberg M, Gómez-Quiroz LE, Loera O. 2011. Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-011-0827-y.

- Gindin G, Glazer I, Mishoutchenko A, Samish M. 2009. Entomopathogenic fungi as a potential control agent against the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* in broiler houses. *BioControl*. 54:549-558.
- Glare TR. 2004. Biotechnological potencial of entomopathogenic fungi. En: Arora DK (ed). Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications. Marcel Dekker Inc, New York. 79-90.
- Hajek AE, St Leger RJ. 1994. Interactions between fungal pathogen and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39:293-322.
- Ibrahim L, Butt TM, Jenkinson P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106:705-715.
- Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST. 2010. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*. 55:129-145.
- Jeffs LB, Khachatourians GG. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*. 43:23-28.
- Jenkins NE, Heviefo G, Lagewald J, Cherry AJ, Lomer CJ. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol/News and Information*. 19(1):21-31.
- Jung-Zhi L, Ya-Ming G, Yu-Fei Z, Guang-Ming T. 2010. Effects of elevated CO₂ on growth and nutrient uptake of *Eichhornia crassipe* under four different nutrient levels. *Water Air Soil Pollut*. 212:387-394.
- Kamp AM, Bidochka MJ. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*. 35:74-77.
- Kang SW, Lee SH, Yoon CS, Kim SW. 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.
- Kim JS, Skinner M, Hata T, Parker BL. 2010. Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of *Bb* y *Ma* conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. *Journal of Invertebrate Pathology*. 105:322-328.
- Le-Tian S, Zheng-Liang W, Sheng-Hua 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 CC, Hajek AE, Humber RA. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.

- Mier T, Toriello C, Ayala-Zermeño MA, Navarro-Barranco H. 2005. Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Miranda-Hernández JF. 2010. Influencia del incremento de O₂ en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 25, 32-35, 71.
- Miranda AMG, Lot HA. 1999. El lirio acuático ¿una planta nativa de México?. *Ciencias*. 50-54.
- Montesinos-Matías R. 2008. Relación entre las variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 27, 28.
- Montesinos-Matías R, Viniestra-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*. DOI 10.1007/s11274-011-0672-z.
- Novelo, A. y L. Ramos, 1998. Pontederiaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 63. Fascículo complementario XX Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Núñez-Gaona O, Saucedo-Castañeda G, Alatorre-Rosas R, Loera O. 2010. Effect moisture content and inoculum level over growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53:771-777.
- Ooijkaas LP, Weber FJ, Buitelaar RM, Tramper J, Rinzema A. 2000. Defined media and inert supports: their potencial as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*. 356-360.
- Orozco-Segovia A, Vázquez-Yáñez C. 1993. Especies invasoras: su impacto sobre las comunidades bióticas. Pronatura, A.C. 29-31.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13:81-84.
- Pérez, C.N. 2004. Manejo Ecológico de Plagas. Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural – CEDAR. 1-296.
- Rahardjo YSP, Weber FJ, le Comte EP, Tramper J, Rinzema A. 2002. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*. 78:539-544.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1(3):1-15.

- Robledo-Monterrubio M, Alatorre-Rosas R, Viniegra-González G, Loera O. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101:222-227.
- Robles-Martínez F, Ramírez-Sánchez IM, Vargas Soto JC, Durán Parámo E. 2008. Efecto de la mezcla de viruta de madera y lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como agente texturizante en el proceso de composteo. I Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, Castellón, 23-24 de julio.
- Rodríguez-Gómez D. 2009. Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* (Bals. Vuill) y su mutante resistente a 2-desoxiglucosa. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 95-110.
- 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.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski, 2004. Manual de Malezas de la Región de Salvatierra, Guanajuato. En: Rzedowski, J. y G. Calderón de R. (eds.). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario XX. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. 1-315.
- Samuels K.D.Z., Heale J.B., Liwellyn M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvate lugen*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53:25-31
- Sarrafzadeh MH, Navarro JM. 2006. The effect of oxygen on the sporulation, δ -endotoxin synthesis and toxicity of *Bacillus thuringiensis* H14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22:305-310.
- Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández MR., Lonsane BK., Navarro JM., Roussos S., Dufour D., Raimbault M. 1994. On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*. 29:13-24.
- Shah FA, Allen N, Wright CJ, Butt TM. 2007. Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 60-66.
- Shah PA, Pell JK. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61:413-423.
- Shaukat A, Zheng H, Shunxiang R. 2009. Media composition influences on growth, enzyme activity and virulence of the pathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. *Netherlands Entomological Society*. 131:30-38.
- Shimazu M. 2009. Media for conidial production of the entomopathogenic fungus, *Fusarium coccophilum* (Anamorphic fungi: Phialosporae). *Applied Entomology and Zoology*. 44 (3):397-402.

- Tlecuitl-Beristain S, Viniegra-Gonzalez 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.
- Tlecuitl-Beristain S. 2010. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos con concentraciones modificadas de O₂ y CO₂. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 1-33.
- Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ. 2003. The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19:363-368.
- Ye SD, Ying SH, Chen C, Feng MG. 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*. 28:799-804.

11. Anexo.

11.1. Cédula de identificación del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

El lirio acuático utilizado en ésta investigación fue proporcionado por el Dr. Ernesto Favela Torres, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en las tablas 11.1.1, 11.1.2 y 11.1.3 se muestran las características del lirio con número de lote FONCICYT/XOC/130609.

Tabla 11.1.1. Perfil general del cuerpo de agua de donde se obtuvo el lirio acuático.

Nombre del cuerpo de agua	Canales de Xochimilco
Ubicación	México, D.F.
Ubicación del punto de recolección	Canal de Japón.
Fecha de recolección	13 de junio 2009
Denominación del Lote	FONCICYT/XOC/130609

Tabla 11.1.2. Perfil general del lirio acuático.

Tamaño	25 a 35 cm de tallo
No. Plantas por m ²	25
Peso por m ²	17 kg
Tamaño del Lote en fresco	400 kg
Características particulares	Plantas sanas, verde característico.

Tabla 11.1.3. Descripción general de la cosecha y procesamiento del lote.

Extracción	Mecánica
Limpieza	Agua
Fragmentado	Mecánico
Selección	Manual
Deshidratado	Irradiación Solar y Horno rotatorio.
Pulverizado	Mecánico
Cribado	Mecánico (4 veces)
Fecha del procesamiento	11 julio 09
Material Obtenido	11 kg de Fibra de lirio

El lirio se tamizó en las mallas del No. 6, 7, 10, 16 y 20, colocadas en el siguiente orden:

Tamiz	Tamaño de partícula
No 6	3.36 mm
No 7	2.88 mm
No 10	2 mm
No 16	1.19 mm
No 20	0.80 mm
Residuos	

Se utilizó el lirio retenido en la malla 10, ya que se consideró tomar el mismo tamaño de partícula que el arroz.

11.2. Cálculos de flujo de aire constante para CSS.

Para determinar el flujo a utilizar en nuestros experimentos con aireación forzada (metodología descrita en la sección 6.9), se consideraron algunos flujos y la máxima producción de CO₂, reportada para algunos hongos entomopatógenos (tabla 11.2).

Tabla 11.2. Flujos de aire y producción de CO₂, reportada para algunos HE.

Hongo	Flujo		Producción de CO ₂	Referencia
<i>M. anisopliae</i> CP-OAX	20 $\frac{cm^3}{seg}$	Pulsos c/24h	-	Tlecuítl-Beristain (2010)
<i>M. anisopliae</i>	0.34 $\frac{mL\ aire}{h \times gssi}$	Constante	185 $\frac{mg\ CO_2}{h}$	Dorta (1996)
<i>Verticillium lecanii</i>	0.43 $\frac{mL\ aire}{min \times gmh}$	Constante	2.3 $\frac{mg\ CO_2}{h \times gssi}$	Barranco-Florida (2002)

Se tomó como punto de partida el flujo de aire reportado por **Barranco-Florida (2002)** y la cantidad de soporte húmedo utilizado en nuestra investigación.

$$Flujo\ de\ aire = \left(0.43 \frac{mL\ aire}{min. \times gmh}\right) \times 297\ gmh = 127.71 \frac{mL\ aire}{min}$$

Posteriormente, se calculo el flujo de CO₂ que puede llegar a producir un hongo, considerando la máxima producción de CO₂ reportada por **Barranco-Florida (2002)** y los gramos de soporte seco utilizados en nuestra investigación.

$$Flujo\ de\ CO_2 = \left(2.3 \frac{mg\ CO_2}{h \times gssi}\right) \times 180\ gssi = 414 \frac{mg\ CO_2}{h}$$

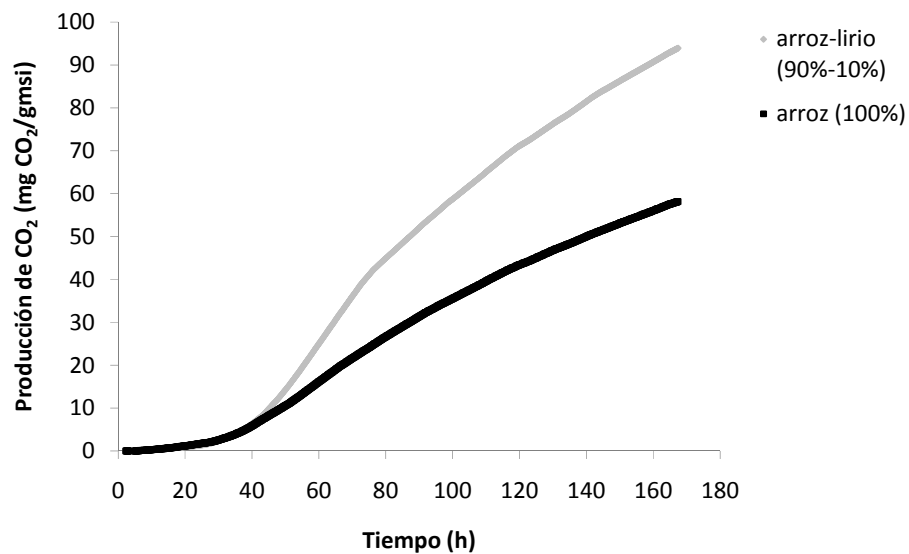
$$= \left(414 \frac{\text{mg CO}_2}{\text{h}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} \right) \times \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.6 \text{ mg CO}_2} \right) = 4.3125 \frac{\text{mL CO}_2}{\text{min}}$$

Finalmente, se calculo una relación de flujos para saber cuántas veces el flujo de aire desplazará el CO₂ producido por el hongo.

$$\text{Relacion} \frac{\text{flujo de aire}}{\text{flujo de CO}_2} = \frac{127.71 \frac{\text{mL aire}}{\text{min}}}{4.3125 \frac{\text{mL CO}_2}{\text{min}}} = 29.6 \frac{\text{mL aire}}{\text{mL CO}_2}$$

11.3. Análisis de respirometría.

Los parámetros de crecimiento (máxima producción de CO₂ y fase lag) para el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1, fueron tomados de la gráfica 11.2 la cual muestra la producción de CO₂ con respecto al tiempo, para arroz se alcanzó una máxima producción de CO₂ de 58.18 mg CO₂/gssi, mientras que para la mezcla arroz-lirio se obtuvo de 93.95 mg CO₂/gssi. Los valores de fase lag fueron de 20 horas para arroz y de 19.9 horas para la mezcla arroz-lirio



Gráfica 11.2. Producción de CO₂ para el hongo *I. fumosorosea* CNRCB1